LUCIANE RASERA

Influência da atividade física sobre a articulação metacarpofalangeana de cavalos de pólo

São Paulo

2007

LUCIANE RASERA

Influência da atividade física sobre a articulação metacarpofalangeana de cavalos de pólo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo

2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1891
FMVZ

Rasera, Luciane

Influência da atividade física sobre a articulação metacarpofalangeana de cavalos de pólo / Luciane Rasera. -- São Paulo: L. Rasera, 2007.
158 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Veterinária, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Equinos. 2. Líquido sinovial. 3. Inflamação. 5. Exercício. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência da atividade física sobre a articulação metacarpofalangeana de cavalos de esporte", protocolo nº527/2004, utilizando 20 cavalos, sob a responsabilidade da Profª Drª Raquel Yvonne Arantes Baccarin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Effects of exercise on metacarpophalangeal joint in athletic horse", protocol number 527/2004, utilizing 20 horses, under the responsibility of Profª Drª Raquel Yvonne Arantes Baccarin agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 22 de novembro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RASERA, Luciane

Título: Influência da atividade física sobre a articulação metacarpofalangeana de cavalos de pólo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Lourdes e Pinduca,
pelo amor incondicional.

Às minhas irmãs, Li e Ana,
pelo companheirismo nesta fase
e sempre....

Aos meus irmãos, Zé e Nel,
pelo apoio em todos estes anos.

Aos meus mestres e amigos, Thiago Luiz de
Salles Gomes e Cristina de Oliveira Massoco,
por tudo o que foi compartilhado e vivido.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Por um começo inusitado na orientação deste projeto,
Por ter acreditado sempre no meu propósito,
Por ter acompanhado de perto cada passo deste trabalho,
Por ter se dedicado em todos os momentos,
Por ter me ensinado, e
Pelo belo exemplo profissional,
Agradeço especialmente,
A minha orientadora, Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

AGRADECIMENTOS

...À Deus, por iluminar minha vida.

...À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde realizei este projeto.

...Ao amigo e mestre Prof. Dr. Roberto Pimenta de Pádua Foz Filho, por ser o principal responsável pela realização deste trabalho, conseguindo a permissão para utilizar os animais, por ter estado sempre por perto, orientando e incentivando nos momentos mais difíceis e pelos ótimos anos de convivência.

...Ao Sr. Carlos Alberto Martins Bastos e filhos, pela permissão em utilizar seus animais da Chácara Maragata em Indaiatuba, SP, acreditando na pesquisa e incentivando a realização deste trabalho.

...Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, pela disposição em ajudar sempre e pela orientação em diversos momentos durante a realização deste projeto.

...Ao amigo, Prof. Dr. Stephano C. Filipo Hagen, pelas conversas de incentivo e indagações, e por ter me orientado na realização dos exames ultra-sonográficos.

...Ao amigo e companheiro de trabalho, Mauricio de Cillo Zinsly, pela confiança, amizade e paciência na realização dos exames radiográficos em todos os animais.

...À amiga e mestra, Dra. Cristina de Oliveira Massoco, pelos momentos cansativos nas coletas e as horas incansáveis no laboratório, pelas palavras de carinho e incentivo, e pelas idéias que deram origem a vários projetos.

...Ao amigo e mestre, Dr. Thiago Luiz de Salles Gomes, pelas conversas e questionamentos intermináveis.

...À amiga Dr. Alma Y. A. Hoge, pela nova amizade conquistada durante as alegres aulas de citologia.

...Aos amigos e companheiros do Hospital de Eqüinos “Salles Gomes, Foz e Associados”, Vanessa Ladeia Sipas, Maurício Zinsly, Paulo Ari Leiria, Paula Yoshida, Luciana Silvano, Luanna Gommès, Guéia, e “Seu Zé”...pelos anos vividos como uma grande família.

...À amiga Luanna Gommès, pela ajuda nas coletas e pela amizade verdadeira.

...Às amigas e irmãs Márcia e Cidinha, pela ótima convivência e por sempre cuidarem de mim.

...À Renata Rossetti, pelo incentivo e auxílio na análise das amostras de TNF.

...À LÍlian Michima, pelo auxílio na redação do abstract.

...Aos funcionários da Chácara Maragata, Indaiatuba, SP, pela disponibilidade e paciência com que ajudaram na coleta de todos os materiais.

...Às funcionárias do laboratório da pós-graduação do Departamento de Clínica Médica, USP, Carmen, Clara e Marli, pelo carinho e processamento das amostras.

...Às funcionárias do laboratório de farmacologia do Departamento de Patologia Experimental, USP, pelo auxílio durante o processamento das amostras.

...Ao amigo Marquinhos, do Hospital de Eqüinos – FMVZ – USP, pela ajuda quando sempre precisei e pelos momentos de descontração.

...Ao Richardt Landgraf, do Instituto de Ciências Biológicas, USP, pela análise da prostaglandina.

...À Adelaide, pela paciência e ótima organização.

...Ao amigo Fernando Valvano Cerezetti, pelo auxílio na análise estatística.

...À amiga e irmã Valéria Ferreira de Souza, por mais esta conquista.

...À amiga Vera Maria Alves Mendes, por estar sempre presente em minha vida.

...Às eternas amigas Cláudia Duarte, Paula Valente e Angélica, que sempre participaram de todas os momentos, de angústias e alegrias.

...Às novas amizades conquistadas, Raquel Lazinho, Silvana Geremias e Verena Wolf, que me acolheram nesta nova etapa.

...À amiga Karen Assunção, pelo apoio em todos os momentos.

...Aos amigos Carlos Humberto Corassin e Paulo Griska, pelas palavras de coragem.

...Aos meus alunos e amigos, Adalberto, Henrique, Gustavo, Fábio, Rafael, Paulo, Marcos, Giovani e Ana Carolina, que me acompanham e me incentivam sempre.

...Aos meus novos colegas de trabalho, Fabrício Bagarolli e Roberto Diaz, pelo apoio e paciência.

...À Faculdade de Jaguariúna, na pessoa do Dr. Ricardo Tannus, que incentivou e apoiou a realização deste trabalho.

...À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio na realização deste projeto.

...Aos animais que carinhosamente participaram deste trabalho.

RESUMO

RASERA, L. **Influência da atividade física sobre a articulação metacarpofalangeana de cavalos de pólo.** [Physical activities influence in metacarpophalangeal joint of the polo ponies]. 2007. 158 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A atividade física, dependendo da intensidade e duração, provoca uma resposta inflamatória nos tecidos articulares dos eqüinos. Como ocorre nos cavalos de pólo que percorrem grandes distâncias em alta velocidade com paradas bruscas do movimento, submetendo suas articulações a esforços intensos e constantes. A finalidade deste trabalho foi avaliar os efeitos da atividade esportiva no metabolismo articular, por meio de exame físico, das dosagens de mediador inflamatório (PGE_2) e citocinas (IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$), da concentração de glicose, proteína total e da análise quantitativa e qualitativa das células presentes no líquido sinovial de 20 eqüinos atletas em três estágios diferentes de treinamento, a cada 30 dias, durante o período de 360 dias: animais sem treinamento (grupo controle), animais em início de treinamento (G1) e animais com mais de 5 anos de treinamento (G2). Além disso, estabelecer uma relação entre os resultados laboratoriais com os exames radiográficos e ultra-sonográficos articulares. Numa segunda fase do experimento foi avaliado o líquido sinovial de oito eqüinos atletas antes do exercício e 3, 6 e 24 horas após o término deste. As principais alterações foram encontradas nos animais do G2, ou seja, aumento da circunferência articular ($P<0,05$), mudança da coloração do líquido sinovial ($P<0,05$), maior volume de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas ($P<0,05$), aumento nas concentrações de proteína ($P<0,05$), glicose ($P<0,05$) e PGE_2 ($P<0,05$). Concomitantemente, estes animais apresentaram aumento de volume dos tecidos moles periarticulares, osteófitos, esclerose óssea e diminuição da flexão articular ($P<0,05$) nos exames radiográficos; além de maior espessura e menor homogeneidade da cápsula articular fibrosa, e maior quantidade de líquido articular visualizado nos exames ultra-sonográficos ($P<0,05$). Já a expressão dos receptores de TNF do tipo II foi maior nas células do líquido sinovial dos animais do G1. Os animais dos grupos 1 e 2 apresentaram maior porcentagem de macrófagos e sinoviócitos ($P<0,05$), do que os animais do grupo controle. Na segunda fase do experimento, foram observadas às 3 e 6 horas mudanças na coloração do líquido sinovial ($P<0,05$), diminuição no volume obtido ($P<0,05$), diminuição da concentração de glicose ($P<0,05$), aumento na concentração de proteína total ($P<0,05$), aumento na concentração de PGE_2 ($P<0,05$). As células do líquido sinovial apresentaram intensidade acentuada de marcação para os receptores de TNF do tipo II também após 3 horas do término do exercício. Conclui-se que um processo inflamatório

articular é desencadeado após o exercício intenso, e a resposta dos tecidos articulares frente a este insulto mecânico, com maior intensidade 3 horas após o término da atividade esportiva, e retornando aos valores basais 24 horas após, revela a excelente adaptação articular ao estresse físico. Esta adaptação também foi observada a longo prazo, em cavalos com maior tempo de carreira esportiva, ou seja, estes animais podem apresentar alterações articulares sem sinais de dor e claudicação. Contudo, isto não impede que cavalos com carreira atlética longa desenvolvam osteoartrite.

Palavras-chave: Eqüinos. Líquido sinovial. Inflamação. Exercício.

ABSTRACT

RASERA, L. **Physical activities influence in metacarpophalangeal joint of the polo ponies.** [Influência da atividade física sobre a articulação metacarpofalangeana de cavalos de pólo]. 2007. 158 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Physical activity causes an inflammatory response in joints depending on intensity and duration of the exercise. Polo ponies, for example, cross large distances at high speed, with abrupt stops of movement, subjecting the joints to intense and constant effort. The purpose of this study was to evaluate the effects of the sporting activity on joint metabolism, by means of physical examination, measurements of inflammatory mediator (PGE₂) and cytokines (IL-1 and TNF- α), glucose and total protein concentrations, and quantitative and qualitative analyses of synovial fluid cells of 20 athletic horses on 3 different stages of training, every 30 days, during a period of 360 days: animals without training (control group), animals in the beginning to train (G1), and animals with more than five years of training (G2). Moreover, the study aimed to establish a relationship between laboratorial results and radiographic and ultrasonographic exams. In a second phase of the trial, synovial fluid analysis was done from samples of eight athletic horses before, and 3, 6 and 24 hours after exercise. Main alterations were found in horses of group 2, which were increase in joint circumference (P<0.05), alteration of the synovial fluid color (P<0.05), greater synovial fluid volume, obtained from metacarpophalangeal joints (P<0.05), greater protein (P<0.05), glucose (P<0.05), and PGE₂ (P<0.05) concentrations. Concomitantly, these animals showed an increase of the periarticular soft tissues, osteophytes, subchondral bone sclerosis, and a diminished joint flexion in radiographic exams (P<0.05), and also a thick and less homogeneous articular capsule, and an increase of the joint fluid quantity in ultrasonographic exams (P<0.05). The TNF type II receptor expression was greater in synovial fluid cells of group 1 horses. Horses of the groups 1 and 2 showed greater percentage of macrophages and synoviocytes (P<0.05) than the animals of the control group. In the second phase of the study, it was observed a change of the synovial fluid color at 3 and 6 hours post-exercise (P<0.05), reduction of the obtained volume (P<0.05) and glucose concentration (P<0.05), and an increase of total protein (P<0.05) and PGE₂ (P<0.05) concentrations. Also, the synovial fluid cells showed an accentuated intensity of markers for TNF type II receptor 3 hours after sports activity was finished. An inflammatory process of the joint is triggered after intense exercise, but the response of the articular tissue facing this mechanical insult, more intense within 3 hours after the end of the

sports activity, and the return to basal values after 24 hours, reveal the excellent adaptation of the articular tissue to physical stress. This adaptation can also be observed in animals with more time of sports career, which can have articular changes without signs of pain or lameness. Nevertheless, this doesn't prevent horses with longer sports careers to develop osteoarthritis.

Key Words: Equine. Synovial Fluid. Inflammation. Exercise

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Valores médios da circunferência articular (cm) das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	65
Figura 2 -	Valores médios finais da circunferência articular (cm) das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	65
Figura 3 -	Foto demonstrando o local da punção da articulação metacarpofalangeana e a aquisição da amostra de líquido sinovial. São Paulo, 2007.....	67
Figura 4 -	Foto demonstrando as diferentes colorações do líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo 2. São Paulo, 2007.....	68
Figura 5 -	Valores médios finais do volume (mL) de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	70
Figura 6 -	Valores médios do volume (mL) de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	71
Figura 7 -	Valores médios finais da contagem total de células nucleadas (cél/s/μL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	72
Figura 8 -	Valores médios da contagem total de células nucleadas (cél/s/μL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	72
Figura 9 -	Valores médios da porcentagem (%) de neutrófilos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	73
Figura 10 -	Valores médios finais da porcentagem (%) de linfócitos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	74

Figura 11 - Valores médios da porcentagem (%) de linfócitos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	75
Figura 12 - Valores médios da porcentagem (%) de monócitos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	76
Figura 13 - Valores médios finais da porcentagem (%) de macrófagos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	77
Figura 14 - Valores médios da porcentagem (%) de macrófagos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	77
Figura 15 - Valores médios finais da porcentagem (%) de sinoviócitos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	78
Figura 16 - Valores médios da porcentagem (%) de sinoviócitos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	79
Figura 17 - Foto ilustrando as células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº09 do grupo 1, no 40º dia. Sinoviócito (seta fina) e monócito (seta larga). São Paulo, 2007. (aumento 100X, imersão).....	80
Figura 18 - Foto ilustrando as células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº27 do grupo 2, no 80º dia. Sinoviócitos (setas). São Paulo, 2007. (aumento 40X).....	80
Figura 19 - Foto ilustrando as células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº07 do grupo 1, no 120º dia. Macrófago (seta). São Paulo, 2007. (aumento 100X, imersão).....	81
Figura 20 - Foto ilustrando as células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº02 do grupo controle, no 40º dia. Sinoviócito (seta maior) e neutrófilos (setas menores). São Paulo, 2007. (aumento 100X , imersão).....	81

Figura 21 - Foto ilustrando as células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº01 do grupo controle, no 40º dia. Linfócito (seta maior) e monócito (seta menor). São Paulo, 2007. (aumento 40X).....	82
Figura 22 - Valores médios finais da proteína total (g/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	83
Figura 23 - Valores médios da proteína total (g/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	83
Figura 24 - Valores médios finais da glicose (mg/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	85
Figura 25 - Valores médios da glicose (mg/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	85
Figura 26 - Valores médios finais da concentração de PGE ₂ (pg/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	87
Figura 27 - Valores médios da PGE ₂ (pg/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	87
Figura 28 - Valores médios do TNF- α (ng/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.....	88
Figura 29 - Fotomicrografia ilustrando o controle negativo da imunocitoquímica das células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº01 do grupo controle, no 80º dia. Marcação realizada apenas com DAB e não com o anticorpo primário. (aumento de 40X). São Paulo, 2007.....	90
Figura 30 - Fotomicrografia ilustrando a marcação da imunocitoquímica das células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº1, no dia zero. Célula com intensidade fraca de marcação (escore 1) para o TNFR _{II} (seta). (aumento de 40X). São Paulo, 2007.....	90

Figura 31 - Fotomicrografia ilustrando a marcação da imunocitoquímica das células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº27 do grupo 2, no 80º dia. Célula não marcada com TNFRII (seta menor) e célula com intensidade moderada de marcação para TNFRII (seta maior). (aumento de 40X). São Paulo, 2007.....	91
Figura 32 - Valores médios finais da espessura da cápsula articular dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através de exame ultra-sonográfico (secção transversal), dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	92
Figura 33 - Valores médios finais da espessura da cápsula articular dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através de exame ultra-sonográfico (secção longitudinal), dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	92
Figura 34 - Valores médios da espessura da cápsula articular dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos por exame ultra-sonográfico (secção transversal), dos animais do grupo controle, 1 e 2 nos dias zero, 210 e 360. São Paulo, 2007.....	93
Figura 35 - Valores médios da espessura da cápsula articular dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos por exame ultra-sonográfico (secção longitudinal), dos animais do grupo controle, 1 e 2 nos dias zero, 210 e 360. São Paulo, 2007.....	94
Figura 36 - Valores médios da espessura do ligamento anular (cm) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos por exame ultra-sonográfico (secção transversal), dos animais do grupo controle, 1 e 2 nos dias zero, 210 e 360. São Paulo, 2007.....	95
Figura 37 - Imagem ultra-sonográfica do plano transversal da cápsula articular dorsal da articulação metacarpofalangeana do animal nº 5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007.....	97
Figura 38 - Imagem ultra-sonográfica do plano longitudinal da cápsula articular dorsal da articulação metacarpofalangeana do animal nº5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007.....	97
Figura 39 - Imagens ultra-sonográficas dos planos longitudinais da inserção do ligamento suspensor do boleto lateral (A) e medial (B) da articulação metacarpofalangeana do animal nº 5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007.....	98
Figura 40 - Imagens ultra-sonográficas dos planos transversais dos ramos lateral (A) e medial (B) do ligamento suspensor do boleto da articulação metacarpofalangeana do animal nº5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007.....	98

Figura 41 - Imagens ultra-sonográficas dos planos longitudinais do ligamento colateral lateral (A) e medial (B) da articulação metacarpofalangeana do animal nº5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007.....	99
Figura 42 - Imagem ultra-sonográfica do plano transversal do ligamento anular e contorno dos ossos sesamóides proximais da articulação metacarpofalangeana do animal nº5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007.....	99
Figura 43 - Imagens radiográficas das articulações metacarpofalangeanas na projeção latero-medial em flexão total do animal nº09 (A) do grupo 1 e do animal nº23 (B) do grupo 2, no dia 120. Imagem utilizada para mensuração do ângulo de flexão articular. Animal nº9 com maior flexão da articulação metacarpofalangeana. São Paulo, 2007.....	101
Figura 44 - Valores médios finais do ângulo de flexão (°) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos por exame radiográfico, dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007.....	102
Figura 45 - Valores médios do ângulo de flexão (°) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através de exame radiográfico, dos animais do grupo controle, nos dias zero, 210 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 120, 210 e 360. São Paulo, 2007.....	102
Figura 46 - Imagens radiográficas da articulação metacarpofalangeana nas projeções latero-medial (A) e dorso-palmar (B) do animal nº27 do grupo 2, no dia zero. São Paulo, 2007.....	103
Figura 47 - Imagens radiográficas da articulação metacarpofalangeana nas projeções dorsomedial-palmarolateral 45° oblíqua (A) e dorsolateral-palmaromedial 45° oblíqua (B) do animal nº7 do grupo 1, no 360° dia. São Paulo, 2007.....	103
Figura 48 - Valores médios da concentração de glicose plasmática (mg/dL) dos cavalos atletas, antes (momento zero), 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. São Paulo, 2007.....	105
Figura 49 - Valores médios do volume (mL) de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas dos cavalos atletas, antes (momento zero), 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. São Paulo, 2007.....	107
Figura 50 - Valores médios da proteína total (g/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos cavalos atletas, antes (momento zero), 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. São Paulo, 2007.....	108
Figura 51 - Valores médios da glicose (mg/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos cavalos atletas, antes (momento zero), 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. São Paulo, 2007.....	109

- Figura 52 - Valores médios da concentração de PGE₂ (pg/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos cavalos atletas, antes (momento zero), 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. São Paulo, 2007..... 110
- Figura 53 - Fotomicrografia ilustrando a marcação da imunocitoquímica das células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº1 às 3 horas após o término do jogo de pólo. Célula com intensidade forte de marcação (escore 3) para TNFRII (seta). (aumento de 40X). São Paulo, 2007..... 111

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A -	Valores médios e desvio padrão da circunferência articular (cm) das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	138
	Valores médios e desvio padrão da proteína total plasmática (g/dL) dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	138
Apêndice B -	Valores médios e desvio padrão da glicose plasmática (mg/dL) dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	139
	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para a coloração do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	139
Apêndice C -	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para o aspecto do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	140
	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para a qualidade do precipitado de mucina do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	140
Apêndice D -	Valores médios e desvio padrão do volume de líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	141
	Valores médios e desvio padrão do número total de células nucleadas do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	141
Apêndice E -	Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de neutrófilos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	142
	Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de linfócitos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	142

Apêndice F –	Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de monócitos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	143
	Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de macrófagos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	143
Apêndice G -	Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de sinoviócitos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	144
	Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de eosinófilos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	144
Apêndice H –	Valores médios e desvio padrão da proteína total (g/dL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	145
	Valores médios e desvio padrão da glicose (mg/dL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	145
Apêndice I –	Valores médios e desvio padrão da concentração de prostaglandina E ₂ (pg/mL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	146
	Valores médios e desvio padrão da concentração de TNF- α (ng/mL) líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	146
Apêndice J -	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para a extensão da marcação do receptor do tipo II de TNF- α nas células do líquido sinovial, através da técnica de imunocitoquímica, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	147

Apêndice J -	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para a intensidade da marcação do receptor do tipo II de TNF- α nas células do líquido sinovial, através da técnica de imunocitoquímica, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	147
Apêndice K -	Número total de articulações e porcentagem (%) do escore total de marcação para o receptor do tipo II de TNF- α nas células do líquido sinovial, através da técnica de imunocitoquímica, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	148
	Valores médios e desvio padrão da espessura da cápsula articular fibrosa dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeas no sentido transversal, obtidos através do exame ultra-sonográfico, nos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	148
Apêndice L -	Valores médios e desvio padrão da espessura da cápsula articular fibrosa dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeas no sentido longitudinal, obtidos através do exame ultra-sonográfico, nos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	149
	Valores médios e desvio padrão da espessura do ligamento anular (cm) das articulações metacarpofalangeas no sentido transversal, obtidos através do exame ultra-sonográfico, nos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	149
Apêndice M -	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para grau de homogeneidade da cápsula articular fibrosa dorsal das articulações metacarpofalangeas, obtidos através do exame ultra-sonográfico, nos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	150
	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para acúmulo de líquido sinovial nas articulações metacarpofalangeas, obtidos através do exame ultra-sonográfico, nos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	150
Apêndice N -	Número total de articulações e porcentagem dos escores para alterações dos tecidos moles periarticulares das articulações metacarpofalangeas, obtidos através do exame radiográfico, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	151

Apêndice N –	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para presença de osteófitos nas articulações metacarpofalangeanas, obtidos através do exame radiográfico, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.....	151
Apêndice O –	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para esclerose do osso subcondral das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através do exame radiográfico, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias zero, 210 e 360 - São Paulo - 2007.....	152
	Valores médios do ângulo de flexão (°) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através do exame radiográfico, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias zero, 210 e 360 - São Paulo - 2007.....	152
Apêndice P -	Valores da concentração da proteína total plasmática (g/dL) dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.....	153
	Valores da concentração da glicose plasmática (g/dL) obtido dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.....	153
Apêndice Q -	Número total de articulações e porcentagem (%) do escore para coloração do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.....	154
	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para aspecto do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.....	154
Apêndice R -	Valores do volume (mL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007..	155
	Valores do número total de células nucleadas (cél/μL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.....	155
Apêndice S -	Valores da concentração da proteína total (g/dL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.....	156

	Valores da concentração da glicose (mg/dL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.....	156
Apêndice T -	Valores da concentração de prostaglandina E ₂ (pg/mL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.....	157
	Valores da concentração de TNF- α (ng/mL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.....	157
Apêndice U -	Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para a extensão, intensidade e escore total de marcação (ETM) do receptor do tipo 2 de TNF- α nas células do líquido sinovial, através da técnica de imunocitoquímica, dos animais atletas, às 3 e 6 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.....	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	ácido hialurônico.
AP-1	proteína ativadora-1.
BSA	albumina sérica bovina.
DAB	diaminobenzidina.
DAD	doença articular degenerativa.
dL	decilitro.
DO	densidade óptica.
EDTA	sal dissódico do ácido etileno-diamino tetracético.
ETM	escore total de marcação.
HE	hematoxilina-eosina.
IL-1	interleucina 1.
IL-6	interleucina 6.
IL-8	interleucina 8.
IL-10	interleucina 10.
mg	miligrama.
mL	mililitro.
ng	nanograma.
NF-κB	fator nuclear κB.
NO	óxido nítrico.
OA	osteoartrite.
PBS	solução tamponada de fostato.
pg	picograma.
PGE ₂	prostaglandina E ₂ .
QPM	qualidade do precipitado de mucina.
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase – tempo real.
TNF-α	fator de necrose tumoral-alpha.
TNFR I	receptor tipo I de TNF.
TNFR II	receptor tipo II de TNF.
μL	microlitro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	30
2.1	LÍQUIDO SINOVIAL.....	30
2.2	ANÁLISE FÍSICA, BIOQUÍMICA E CITOLÓGICA DO LÍQUIDO SINOVIAL.....	33
2.3	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E CITOCINAS.....	38
2.4	EXAMES RADIOGRÁFICO E ULTRA-SONOGRÁFICO.....	45
3	OBJETIVOS.....	49
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1	ANIMAIS.....	50
4.2	AVALIAÇÃO FÍSICA.....	51
4.2.1	Avaliação Semanal.....	51
4.2.2	Mensuração da Circunferência Articular.....	51
4.3	COLETA DE SANGUE.....	52
4.3.1	Dosagem da Proteína Total Plasmática.....	52
4.3.2	Dosagem da Glicose Plasmática.....	52
4.4	COLETA DE LÍQUIDO SINOVIAL.....	52
4.4.1	Análise Física do Líquido Sinovial.....	53
4.4.2	Teste do Precipitado de Mucina.....	53
4.4.3	Contagem Total e Diferencial das Células do Líquido Sinovial.....	54
4.4.4	Dosagem da Proteína Total do Líquido Sinovial.....	54
4.4.5	Dosagem da Glicose do Líquido Sinovial.....	54
4.4.6	Determinação da IL-1 do Líquido Sinovial.....	55

4.4.7	Determinação da PGE₂ do Líquido Sinovial	55
4.4.8	Determinação do TNF-α do Líquido Sinovial	56
4.4.9	Técnica de Imunocitoquímica	56
4.5	EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO	58
4.6	EXAME RADIOGRÁFICO	59
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
4.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	61
5	RESULTADOS	64
5.1	EXPERIMENTO 1	64
5.1.1	Avaliação Física	64
5.1.1.1	Avaliação Semanal.....	64
5.1.1.2	Mensuração da Circunferência Articular.....	64
5.1.2	Dosagem da Proteína Total Plasmática	66
5.1.3	Dosagem da Glicose Plasmática	66
5.1.4	Coleta de Líquido Sinovial	66
5.1.5	Análise do Líquido Sinovial	67
5.1.5.1	Coloração do Líquido Sinovial.....	67
5.1.5.2	Aspecto do Líquido Sinovial.....	68
5.1.5.3	Teste do Precipitado de Mucina.....	69
5.1.5.4	Volume de Líquido Sinovial.....	69
5.1.5.5	Contagem Total e Diferencial das Células do Líquido Sinovial.....	71
5.1.5.6	Proteína Total do Líquido Sinovial.....	82
5.1.5.7	Glicose do Líquido Sinovial.....	84
5.1.5.8	Concentração de IL-1 do Líquido Sinovial.....	86
5.1.5.9	Concentração de PGE ₂ do Líquido Sinovial.....	86

5.1.5.10	Concentração de TNF- α do Líquido Sinovial.....	88
5.1.5.11	Análise da Imunocitoquímica das Células do Líquido Sinovial.....	89
5.1.6	Exame Ultra-sonográfico das Articulações Metacarpofalangeanas.....	91
5.1.7	Exame Radiográfico das Articulações Metacarpofalangeanas.....	100
5.2	EXPERIMENTO 2.....	104
5.2.1	Avaliação Física.....	104
5.2.1.1	Avaliação Pós-jogo.....	104
5.2.2	Dosagem da Proteína Total Plasmática.....	104
5.2.3	Dosagem da Glicose Plasmática.....	104
5.2.4	Coleta de Líquido Sinovial.....	105
5.2.5	Análise do Líquido Sinovial.....	106
5.2.5.1	Coloração do Líquido Sinovial.....	106
5.2.5.2	Aspecto do Líquido Sinovial.....	106
5.2.5.3	Volume de Líquido Sinovial.....	107
5.2.5.4	Contagem Global das Células do Líquido Sinovial.....	107
5.2.5.5	Proteína Total do Líquido Sinovial.....	108
5.2.5.6	Glicose do Líquido Sinovial.....	108
5.2.5.7	Concentração de PGE ₂ do Líquido Sinovial.....	109
5.2.5.8	Concentração de TNF- α do Líquido Sinovial.....	110
5.2.5.9	Análise da Imunocitoquímica das Células do Líquido Sinovial.....	110
6	DISCUSSÃO.....	112
7	CONCLUSÃO.....	128
	REFERÊNCIAS.....	129
	APÊNDICES.....	138

1 INTRODUÇÃO

Devido ao intenso treinamento que os equinos atletas são submetidos, há um aumento na carga imposta aos seus tecidos articulares, podendo provocar sinovite mecanicamente induzida, com liberação de mediadores inflamatórios pelas células sinoviais e aumento da permeabilidade capilar. Esta inflamação pode acarretar em desequilíbrio entre os processos de síntese e degradação de proteoglicanos e glicosaminoglicanos da matriz cartilaginosa levando à doença articular degenerativa e conseqüente perda de função.

Vários cavalos atletas, que passam por esse tipo de regime de treinamento, apresentam um grau de inflamação articular não diagnosticado. Nestes casos, com a repetição do insulto à articulação, tem-se início o processo degenerativo da cartilagem articular através da produção e liberação de citocinas, e conseqüente estimulação de metaloproteinases e de outros componentes inflamatórios. Caso a inflamação persista, a conseqüência final é o desenvolvimento da osteoartrite (OA) ou doença articular degenerativa (DAD), levando à perda da função articular e queda do desempenho atlético. Tal fato torna-se relevante uma vez que vários trabalhos constataram que a grande causa de desgaste e conseqüente término de carreira esportiva de equinos jovens é a doença articular (ROSSDALE et al., 1985; McILWRAITH, 1996).

Nas últimas décadas houve uma explosão de trabalhos relacionados à estrutura e função das articulações sinoviais, particularmente sobre cartilagem articular. É certo que a melhor compreensão do metabolismo articular, bem como da função e estrutura das articulações sinoviais propiciará uma maior habilidade em se prevenir, diagnosticar, tratar e oferecer prognóstico para os casos de doenças articulares resultantes da prática de esportes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LÍQUIDO SINOVIAL

O líquido sinovial encontra-se nas áreas do esqueleto apendicular onde há fricção das superfícies adjacentes, como articulações, bursas e bainhas tendíneas. Nas articulações diartrodiais, ou sinoviais, as extremidades ósseas estão recobertas pela cartilagem articular; o espaço articular é delineado pela membrana sinovial e o líquido sinovial lubrifica os tecidos articulares (MAHAFFEY, 1992). Este líquido sinovial é um ultrafiltrado do plasma ao qual o ácido hialurônico é adicionado à medida que ele é sintetizado e secretado pelos sinoviócitos (WASSERMAN; KALLFELZ; LUST, 1993). O líquido fornece nutrientes à cartilagem articular e funciona como um lubrificante para os tecidos peri-articulares (MacWILLIAMS; FRIEDRICHS, 2003).

A origem e a natureza do líquido sinovial nas articulações normais foram estudadas por vários autores, dando origem às várias teorias a cerca de sua formação (KLING, 1931; ROPES; BENNETT; BAUER, 1939; RHINELANDER; BENNETT; BAUER, 1939). Nas diversas teorias propostas o líquido sinovial era considerado um produto das secreções das células ou glândulas da membrana sinovial, assim como uma mistura dos produtos de desintegração da membrana sinovial que ocorriam durante a movimentação articular e um transudato dos capilares e vasos linfáticos. Ropes, Bennett e Bauer (1939) em um ensaio experimental com articulações normais de bovinos jovens, após várias análises físicas e químicas dos constituintes do líquido concluíram que a distribuição destes elementos entre o soro e o líquido, assim como as naturezas dos suprimentos vasculares da membrana sinovial, corroboraram com a teoria de que o líquido sinovial é um dializado do plasma, mas não conseguiram explicar a origem da mucina presente.

A permuta de líquidos entre o plasma e o líquido sinovial parece ser controlada pelas forças de Starling, isto é, pelas diferenças de pressão hidrostática e coloidosmótica entre o plasma e o líquido sinovial. A ausência de uma membrana basal e a proximidade dos capilares à superfície interna da membrana sinovial facilitam a troca de solutos. A barreira permeável da membrana sinovial às moléculas de baixo peso molecular é devido ao espaço estreito entre os sinoviócitos e os componentes da matriz extracelular. Estas moléculas usualmente estão em equilíbrio entre o plasma e o líquido sinovial e geralmente atravessam a membrana por difusão simples. O transporte de glicose para o líquido é uma exceção, ocorrendo provavelmente mais por difusão facilitada do que por transporte ativo, já que esta molécula entra na articulação mais rapidamente que outras moléculas pequenas (WASSERMAN; KALLFELZ; LUST, 1993).

Segundo Rhineland, Bennett e Bauer (1939) as soluções aquosas injetadas por via intra-articular são absorvidas das articulações principalmente pela via vascular, com pequenas quantidades das drogas sendo drenadas pelo sistema linfático. Estes autores relatam ainda que o exercício e a inflamação sinovial aumentam significativamente a absorção destas substâncias pelo sistema circulatório, via capilares sinoviais. Este permuta entre o líquido e a vascularização sinovial é de grande importância nas alterações agudas de volume e de concentração dos constituintes do líquido sinovial, durante os processos patológicos.

A membrana sinovial é um tecido conjuntivo vascular que reveste a superfície interna da cápsula, mas não recobre as superfícies de seus bordos inferiores. Consiste em elementos formados junto com a matriz intercelular, tais como fibras e células (WASSERMAN; KALLFELZ; LUST, 1993). Possui um revestimento celular superficial composto de dois tipos morfológicamente distintos de sinoviócitos: células do tipo A (linhagem macrofágica) e células do tipo B (linhagem fibroblástica). O primeiro tipo possui funções absorptivas e o segundo é caracterizado por células próprias que secretam colágeno, fibronectina, hialuronato

e outros proteoglicanos para dentro do interstício e cavidade articular (SHIKICHI et al, 1999). A nomenclatura dos sinoviócitos varia de acordo com os autores. Os sinoviócitos macrofágicos são nomeados como células do tipo A, macrófagos sinoviais ou células M e A (absortivas); já os sinoviócitos tipo fibroblásticos, são chamados de células do tipo B, sinovioblastos ou células F e S (secretoras) (SHIKICHI et al., 1999; IWANAGA et al., 2000).

Os sinoviócitos do tipo B são células próprias e fixadas na íntima sinovial, ao contrário das células do tipo A que são originárias dos macrófagos. As células do tipo B estão engajadas na secreção de hialuronato, glicoproteínas e outros componentes para o líquido sinovial, portanto seu íntimo contato com a cavidade sinovial, através da sua ampla superfície celular, pode ser efetiva na execução de sua função secretora (EDWARDS, 1994). A superfície estrutural dos sinoviócitos do tipo A é idêntica aos macrófagos e estas células são imunoreativas a muitos anticorpos monoclonais antimacrófagos e substâncias derivadas dos macrófagos. Fisiologicamente eles podem absorver e degradar constituintes extracelulares, debris celulares, microrganismos e antígenos no líquido sinovial e na matriz. Portanto os sinoviócitos do tipo A possuem um papel importante na manutenção da homeostase articular, incluindo o *turnover* dos componentes do líquido sinovial, e também na regulação das reações inflamatórias (GRAABAEK, 1982; SHIKICHI et al., 1999).

Os marcadores bioquímicos do líquido sinovial (biomarcadores) são moléculas presentes na cavidade articular, e são resultado do metabolismo da membrana sinovial e da cartilagem articular. Estas proteínas refletem o estado metabólico da cartilagem articular e servem como marcadores da severidade da artrite nos animais e seres humanos (LOHMANDER, 1994).

2.2 ANÁLISE FÍSICA, BIOQUÍMICA E CITOLÓGICA DO LÍQUIDO SINOVIAL

No exame laboratorial do líquido sinovial inclui-se a avaliação das características físicas (volume, coloração e aspecto), testes bioquímicos, contagem celular e análise diferencial das células nucleadas (HARDY; WALLACE, 1974). O volume geralmente é avaliado subjetivamente, pois este pode variar em proporção direta com o tamanho da cavidade articular e sua comunicação com outra articulação (HARDY; WALLACE, 1974; VAN PELT, 1974). Segundo Van Pelt (1974) as articulações de cavalos jovens geralmente contêm maiores quantidades de líquido sinovial do que as dos cavalos adultos.

O movimento articular normal é intermitente, com períodos cíclicos de movimentos alternados com períodos de imobilidade (LEVICK, 1987). O deslocamento do líquido sinovial dentro da cavidade articular é importante para a nutrição da cartilagem, sendo que há um aumento deste deslocamento nas articulações submetidas ao exercício. O simples movimento passivo das articulações normais causa um leve aumento no volume do líquido sinovial, acompanhado pela diluição da proteína e, além disso, provoca hiperemia sinovial e sinovite mecanicamente induzida (LEVICK, 1987). Estas alterações são mais complexas durante os movimentos ativos, sendo determinadas não somente pelo ângulo articular, mas também pelo efeito mecânico dos músculos que agem ao redor das articulações. A flexão passiva vigorosa também pode aumentar a permeabilidade à macromoléculas e algumas partículas (LEVICK, 1987).

Persson (1971) observou um aumento significativo do volume de líquido sinovial durante o exercício, persistindo por uma hora após o término deste, o que pode ser explicado pelo aumento da difusão de soro para a cavidade articular. Também há evidências de que em resposta às variações de pressão, viscosidade e mudanças na composição química, os sinoviócitos podem autoregular a secreção de componentes para dentro da matriz

cartilaginosa e cavidade articular (IWANAGA et al., 2000). Em um estudo realizado por Hardy, Bertone e Muir (1998) foi observado um aumento na produção de líquido sinovial associado ao aumento na pressão intra-articular nas articulações com processo inflamatório ativo.

A aparência física do líquido sinovial e a interpretação das alterações desta aparência são similares às utilizadas para outros líquidos cavitários. O líquido sinovial normal é claro e límpido. Líquidos avermelhados indicam hemorragias intra-articulares (hemartrose) associadas ao trauma ou inflamação, ou ao procedimento da artrocentese com o sangramento da membrana sinovial (iatrogênica). A xantocromia indica um processo hemorrágico anterior, com quebra da hemoglobina, sendo caracterizada pela coloração alaranjada do líquido sinovial (PERSSON 1971; VAN PELT, 1974; MAHAFFEY, 1992; MacWILLIAMS; FRIEDRICHS, 2003). A suspensão de partículas como hemácias, leucócitos, microrganismos, fibrinas, células neoplásicas ou cristais, podem dar origem a um líquido sinovial com aspecto turvo (MacWILLIAMS; FRIEDRICHS, 2003).

O líquido sinovial das articulações normais não coagula, mas tende a formar um gel. A agitação deste gel faz o líquido sinovial retornar ao seu estado líquido, e a este fenômeno dá-se o nome de tixotrofismo (FERNANDEZ et al., 1983). Segundo Persson (1971) o líquido sinovial não contém substâncias coagulantes ativas, como protrombina, fibrinogênio, tromboplastina e antitrombina, devido à permeabilidade seletiva da membrana sinovial.

Em cavalos com doenças articulares, principalmente com sinovite ativa, o líquido sinovial apresenta-se com a viscosidade diminuída. Esta redução na viscosidade também é devido à diminuição na concentração do ácido hialurônico (AH), a maior macromolécula do líquido sinovial, ou no seu grau de polimerização (TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1994; TULAMO et al., 1996; CARON, 2003). Entretanto, as articulações dos cavalos em treinamento apresentam um aumento no volume do líquido sinovial com conseqüente diluição

do AH (PERSSON, 1971). Logo, o conteúdo do hialuronato pode estar diminuído decorrente dos danos à membrana sinovial, diluição pelo influxo de plasma ou degradação pelas células nucleadas ou bactérias (MacWILLIAMS; FRIEDRICHS, 2003).

O teste para a qualidade do precipitado de mucina (QPM) fornece um índice semiquantitativo confiável do grau de polimerização da molécula de AH presente no líquido sinovial. Tanto o grau de polimerização do AH quanto sua concentração influenciam na viscosidade do líquido (VAN PELT, 1974; MAHAFFEY, 1992).

A maioria das proteínas plasmáticas são excluídas do líquido sinovial pela propriedade filtrativa da membrana sinovial e do AH encontrado nos tecidos conectivos peri-sinoviais. Algumas glicoproteínas são sintetizadas pelos sinoviócitos e secretadas dentro do líquido sinovial (PERSSON, 1971; MAHAFFEY, 1992). Segundo Curtiss (1964) e Levick (1987) o líquido sinovial normal contém aproximadamente 30% da proteína plasmática. MacWillims e Friedrichs (2003) relatam que os valores normais da proteína total no líquido sinovial estão entre 1,5 a 3,0 g/dL, podendo ocorrer variações de acordo com o método de análise utilizado.

Segundo Van Pelt (1974) na inflamação articular, o aumento no conteúdo protéico é atribuído à entrada de albumina, decorrente da maior permeabilidade capilar. Hardy, Bertone e Muir (1998) estimaram o influxo de proteína sangue-articulação para avaliar a permeabilidade da membrana sinovial às proteínas, e concluíram que nas articulações inflamadas houve um aumento de cinco vezes na permeabilidade quando comparada às articulações normais, sendo que o maior aumento esteve relacionado à albumina, na região das vilosidades sinoviais.

Nilsson e Persson (1973) observaram que o líquido sinovial de articulações com lesões cartilagueas apresentaram aumento na quantidade de proteína e diminuição da viscosidade, e articulações com lesões na membrana sinovial possuíam além do aumento da quantidade de proteína, aumento do número de leucócitos e da viscosidade. Igualmente ao observado na

concentração de AH, Persson (1971) relatou o aumento da proteína em conjunção com o exercício, sendo maior na articulação metacarpofalangeana, e atribuiu esta diferença ao tipo de movimento articular realizado e à anatomia da membrana sinovial.

Para avaliar a concentração de glicose presente no líquido sinovial deve-se obter uma amostra de sangue no mesmo momento da artrocentese. Em um cavalo normal, se alimentando, a concentração de glicose no sangue e no líquido devem ser equivalentes. A diferença entre as concentrações de glicose (plasma-líquido sinovial) deverá estar próxima a 10 mg/dl. Nas doenças articulares a concentração de glicose no líquido sinovial está diminuída, podendo até mesmo chegar a zero (VAN PELT, 1974), uma vez que a diferença plasma-líquido sinovial estará aumentada. Geralmente uma diferença entre plasma-líquido sinovial que excede a 25 mg/dL pode estar associada às condições inflamatórias (MAHAFFEY, 1992).

Segundo Curtiss (1964), com a severidade da inflamação quantidades menores de glicose entram na articulação, o que desequilibra a homeostase normal entre a entrada e utilização da glicose.

A formação de efusão sinovial é similar, independentemente se for mediada pela injúria da cartilagem, que ocorre na doença articular degenerativa (DAD), ou pela sinovite, diferindo principalmente na característica e severidade do infiltrado celular (MacWILLIAMS; FRIEDRICHS, 2003). Sendo assim, o tipo e o número de leucócitos que infiltram a membrana sinovial e migram para o líquido sinovial definirão o componente celular da efusão articular (MacWILLIAMS; FRIEDRICHS, 2003), e a contagem total de células nucleadas do líquido sinovial permitirá distinguir condições inflamatórias de não-inflamatórias (SUGIUCHI et al., 2005).

A celularidade freqüentemente observada no líquido sinovial inclui neutrófilos (em pequena quantidade), linfócitos, monócitos, macrófagos, e poucas células da membrana

sinovial, os sinoviócitos. Como já mencionado, dois tipos de sinoviócitos são encontrados na membrana sinovial, o tipo A (macrofágico) e o tipo B (fibroblástico) (IWANAGA et al., 2000). A migração das células do tipo A para a cavidade articular pode explicar a rica existência de células macrofágicas no líquido sinovial normal (CURTISS, 1964).

Como a maioria das células do líquido sinovial é fagocítica, conclui-se que sua principal função é a remoção de debris que aparecem na articulação em seu uso normal, isto devido aos efeitos abrasivos do movimento sobre a membrana sinovial, fazendo com que fragmentos fibrosos e membranosos do tecido sinovial sejam encontrados no líquido sinovial normal (CURTISS, 1964). Warren, Bennett e Bauer (1935) observaram maior porcentagem de células fagocitárias nas articulações carpo-metacárpicas de bovinos, as quais apresentavam também maior quantidade de debris e lesões cartilagíneas. Mas Warren, Bennett e Bauer (1935) ainda relataram a dificuldade de diferenciação das células mononucleares fagocitárias dos linfócitos, devido a intensidade de coloração das células, observando que há uma contração das células do líquido sinovial.

Investigações em humanos mostraram que em articulações normais em repouso o número de leucócitos no líquido sinovial varia de 32-170 células/mm³, e na mesma articulação em movimento estes valores aumentam para 250-690 células/mm³. A razão para este aumento é atribuída ao microtrauma mecânico à membrana sinovial durante o movimento, fazendo com que haja aumento da atividade celular (PERSSON, 1971). Logo, o padrão normal depende do tipo de desgaste e traumas menores ao qual a articulação é submetida (DAVIES, 1945). Warren, Bennett e Bauer (1935) relataram uma variação normal na contagem de células nucleadas da articulação do tarso em bovinos, e relacionaram esta variação com o grau de desgaste articular, traumas pequenos e ao esforço que a articulação estava sendo submetida no momento da avaliação.

Nas artrites inflamatórias a contagem total de células nucleadas pode alcançar valores próximos ou maiores a 2000 células/mm³ com 75% de polimorfonucleares, enquanto que nas artrites infecciosas este número pode chegar a 50.000 células/mm³, com 90% de polimorfonucleares (SUGIUCHI et al., 2005).

Na presença de inflamação, as enzimas livres no líquido sinovial quebram a molécula do hialuronato, o volume de líquido sinovial aumenta e a viscosidade diminui (SUGIUCHI et al., 2005). Em resposta a um insulto, os condrócitos e sinoviócitos liberam citocinas que causam vasodilatação dos capilares sub-sinoviais, levando a aumento da permeabilidade e extravasamento de líquido, proteína e células inflamatórias para dentro do espaço articular, principalmente neutrófilos e monócitos. Concomitantemente ocorre a estimulação dos macrófagos, e novamente dos sinoviócitos e condrócitos que modulam a produção de citocinas, eicosanóides e enzimas degradativas da matriz (PALMER; BERTONE, 1994; MAY, 1997).

2.3 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E CITOCINAS

A inflamação é uma resposta necessária do sistema imune aos diferentes estímulos nocivos, resultando em uma produção elevada de mediadores inflamatórios e de citocinas, cuja ativação crônica está associada com vários efeitos deletérios. A osteoartrite é considerada uma doença articular de caráter não inflamatório. Entretanto, vários estudos indicam a presença de uma inflamação intra-articular, caracterizada pela sinovite, e que este baixo nível de resposta inflamatória tem um papel fundamental na fisiopatologia da enfermidade (SCHLAAK et al., 1996; GOLDRING, 1999; GHOSH; SMITH, 2002; IRIE; UCHIYAMA; IWASO, 2003; SCHUERWEGH et al., 2003; PENNINX et al., 2004; BENITO et al., 2005).

A inflamação da membrana sinovial está envolvida na fisiopatologia da osteoartrite. Myers et al. (1990) observaram que o tecido sinovial de pacientes com osteoartrite é caracterizado pela infiltração de células mononucleares e produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores da destruição articular. Benito et al. (2005) compararam a resposta inflamatória nos tecidos sinoviais de pacientes com osteoartrite inicial com os de pacientes com sinais crônicos da afecção, concluindo que a maior expressão dos mediadores inflamatórios na osteoartrite inicial reflete em uma ativação das vias fisiopatológicas da degradação cartilaginosa progressiva.

O processo inflamatório resulta em aumento nos níveis de mediadores inflamatórios e liberação de diferentes macromoléculas e seus fragmentos no líquido sinovial (LOHMANDER; FELSON, 1997). Os marcadores biológicos são utilizados como indicadores diretos ou indiretos do metabolismo anormal dos tecidos ósseos e cartilagíneos (McILWRAITH, 2005). Estes marcadores biológicos são produtos normais ou moléculas formadas no processo metabólico normal dos tecidos (BILLINGHRUST, 2002), e são utilizados para elucidar os processos fisiopatológicos articulares, diferenciar as articulações doentes das saudáveis, distinguir o grau de degradação da cartilagem articular e monitorar a resposta à terapia medicamentosa (McILWRAITH, 2005).

O monitoramento de uma única articulação geralmente é realizado pela análise do líquido sinovial. A artrocentese e a análise do líquido podem confirmar a presença de artrite, caracterizar a resposta como inflamatória ou não inflamatória e, em algumas circunstâncias, revelar o agente etiológico, assim como fornecer informações sobre o sucesso do tratamento e a avaliação do prognóstico (VAN PELT, 1974; MacWILLIAMS; FRIEDRICHS, 2003).

Os marcadores biológicos indiretos não são derivados diretamente dos tecidos articulares, mas possuem o potencial de influenciar o metabolismo destes tecidos ou a

integridade da matriz cartilaginosa, e dentre eles estão as citocinas pró-inflamatórias (McILWRAITH, 2005).

O catabolismo excessivo na cartilagem articular, mesmo na ausência dos sintomas de osteoartrite, resulta na liberação no líquido sinovial de produtos de degradação da matriz, incluindo proteoglicanos, colágeno, condroitina, membrana dos condrócitos, etc., todos possuindo propriedades antigênicas, podendo levar a uma resposta inflamatória da membrana sinovial. As células ativadas da membrana sinovial recrutam neutrófilos da circulação estabelecendo assim uma sinovite e liberação de citocinas (GHOSH; SMITH, 2002). Estes mediadores podem agir nos condrócitos e sinoviócitos modificando a síntese de proteoglicanos, colágeno e hialuronato e promovendo a liberação de mediadores catabólicos (GHOSH; SMITH, 2002).

As citocinas e o óxido nítrico, liberados no líquido sinovial, participam da manutenção da sinovite e da destruição articular na osteoartrite, além de provocarem uma congestão venosa e osteonecrose no osso subcondral. A morte óssea e o remodelamento levam a uma sobrecarga adicional nas áreas de maior estresse da cartilagem articular (GHOSH, 1999).

Citocina é um termo geral para descrever as pequenas proteínas regulatórias produzidas por uma variedade de células no organismo. Nas articulações estes mediadores existem em um complexo equilíbrio de atividade que regula o metabolismo da membrana sinovial, osso e cartilagem articular (CARON, 2003). Muitas citocinas estão envolvidas no metabolismo articular, possuindo uma ou mais funções: pró-inflamatória (catabólica), antiinflamatória (regulatória) ou anabólica. Nos casos de osteoartrite são importantes as citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Estas citocinas são conhecidas como catabolinas, pois causam mudanças degenerativas na cartilagem articular, provavelmente através da ativação das metaloproteinases (CARON,

1992), e induzem a produção de prostaglandina E_2 (PGE_2), um importante mediador da resposta inflamatória, pelos sinoviócitos e condrócitos (HAWKINS et al., 1995).

As citocinas pró-inflamatórias são amplamente estudadas como marcadores da doença articular. Van den Boom et al. (2004) e Van den Boom et al. (2005) observaram aumento discreto nos níveis destes marcadores biológicos, incluindo o $TNF-\alpha$, óxido nítrico e prostaglandina E_2 após artrocentese seriada ou exercício.

Irie, Uchiyama e Iwaso (2003) estudaram a dinâmica da inflamação articular nos joelhos de pacientes humanos com ruptura do ligamento cruzado por meio da quantificação de $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10. Observaram que os níveis mais altos destas citocinas foram detectados dentro de 24 horas após a injúria articular, sugerindo envolvimento no processo de cicatrização do ligamento danificado. Sabe-se que as citocinas inflamatórias têm um papel importante na fase inflamatória do processo cicatricial, fazendo o papel de mediadores químicos da cicatrização. Elas estão envolvidas na migração dos fibroblastos e na formação do tecido de granulação.

A IL-1 estimula a degradação dos proteoglicanos e diminui a síntese de colágeno e proteoglicanos pelos condrócitos, encontrando-se em concentrações elevadas no líquido sinovial de equinos com osteoartrite (MORRIS et al., 1990; ARMSTRONG; LEES, 2002). A IL-1 é liberada precocemente na doença articular, precedendo os sinais clínicos e macroscópicos das lesões da cartilagem articular (BERTONE; PALMER; JONES, 2001).

O $TNF-\alpha$ é encontrado em elevadas concentrações em articulações inflamadas e está envolvido no desenvolvimento de lesões osteoartríticas, sendo produzido pelos fagócitos mononucleares (BOURY et al., 1998). Ele estimula a síntese de enzimas degradativas da matriz extracelular e de PGE_2 e inibe a síntese de proteoglicanos e colágeno pelos condrócitos (McILWRAITH, 1996; MAY, 1997; CARON, 2003), tendo um papel predominante no início e progressão da destruição da cartilagem articular (PENNINX et al., 2004). Segundo Maini

(2004) a síntese do TNF- α nas articulações com artrite reumatóide parece ser predominantemente localizada nos macrófagos da camada íntima da membrana sinovial. Um estudo da cinética celular mostrou a produção sequencial das citocinas com as células secretoras de TNF- α aparecendo antes das células produtoras de IL-1 e IL-6, nas fases iniciais da artrite clínica. A inflamação crônica é perpetuada pela ação destas moléculas, e com a perda da homeostase articular ocorre o desequilíbrio entre a expressão das citocinas e moléculas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, com o TNF- α tendo um papel dominante na regulação do processo inflamatório (MAINI, 2004).

Existem dois receptores distintos do TNF- α , o receptor do tipo I (TNFRI, 55 kD) e o receptor do tipo II (TNFRII, 75 kD), cada um codificado por um gene separado e estando presente em quase todos os tipos de células examinadas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000), além do receptor solúvel. Porém, muitas moléculas de TNFRII estão localizadas na superfície celular, que na presença de um ligante, são revestidas por uma vesícula endocítica e levadas para o interior da célula, ativando vários compartimentos subcelulares, incluindo a membrana plasmática, mitocôndria e o núcleo (LEDGERWOOD; POBER; BRADLEY, 1999). Em um estudo feito por Alaaeddine et al. (1997) observou-se que o TNF- α e seu receptor solúvel possuem um efeito direto na progressão da doença articular degenerativa. Penninx et al. (2004) mostraram que a alta concentração sérica do receptor solúvel do TNF- α está associada com a função física e sintomas da doença em paciente com osteoartrite. Isto sugere a importância do TNF- α e seu receptor solúvel na progressão da doença articular, e indica a existência de um componente inflamatório na osteoartrite. Amin (1999) relata que os fibroblastos sinoviais das articulações com osteoartrite expressam maiores quantidades dos receptores de TNF- α , e que a perda focal da cartilagem articular está associada com uma maior expressão do TNFRI, apresentando então uma maior susceptibilidade aos efeitos do TNF- α comparados à cartilagem normal.

Segundo Maini (2004) a ligação do TNF aos seus receptores promove a agregação dos monômeros na membrana plasmática e o recrutamento de proteínas como o fator 2 associado ao TNF-R e Fas-associado ao domínio de morte celular que iniciam uma sinalização intracelular. Estas sinalizações ativam várias vias incluindo a MAP-cinases e NF- κ B, o qual resulta em uma resposta inflamatória via transcrição genética das moléculas pró-inflamatórias. Alternativamente esta sinalização pode acarretar na apoptose celular via ativação das caspases. Parece existir uma relação recíproca entre a sinalização inflamatória e apoptótica de forma que somente uma delas predomina (MAINI, 2004). De acordo com Abbas, Lichtman e Pober (2000) a ligação com o receptor de membrana do tipo I (TNFRI) com domínio citoplasmático para a morte celular (TRADD) ativa a apoptose celular, mas a ligação com o receptor de membrana do tipo II (TNFRII) ativa os fatores de transcrição nas células alvo (NF- κ B e AP-1) com produção dos mediadores inflamatórios, dentre eles as prostaglandinas.

Van den Berg (2001) relatou que o TNF e a IL-1 são as principais citocinas no processo da inflamação crônica articular e a concomitante alteração erosiva na cartilagem, sendo que a IL-1 é mais potente do que o TNF em induzir a destruição da cartilagem. Poucas quantidades de IL-1 são suficientes para causar a inibição na síntese de proteoglicanos, enquanto quantidades maiores de TNF são necessárias para causar o mesmo efeito na cartilagem (VAN DEN BERG, 2001). Além disso, a IL-1 e o TNF induzem a expressão de metaloproteinases 3 e 13 na matriz cartilaginosa (LITTLE et al, 2005).

May (1997) relatou que a IL-1, IL-6 e o TNF- α são encontrados com relativa abundância no líquido sinovial de uma variedade de artrites em humanos. Neste estudo, as concentrações de IL-1 e IL-6 foram maiores nos casos de artrite inflamatória, como a artrite reumatóide, e a concentração de TNF- α maior nos casos de osteoartrite, sendo correlacionada com a cronicidade da doença.

Bertone, Palmer e Jones (2001) mediram as concentrações dos mediadores inflamatórios no líquido sinovial de equinos para identificar as categorias clínicas da doença articular, concluindo que as de IL-1 β e TNF- α detectaram mais de 80% das doenças articulares agudas. Callum et al. (1997) observaram alterações significativas nas concentrações de TNF- α , IL-6 e óxido nítrico (NO) no líquido sinovial de cães com osteoartrite secundária ao rompimento do ligamento cruzado cranial. Trumble et al. (2001) concluíram que a expressão de TNF- α é maior na cartilagem de articulações que sofrem trauma agudo.

Nos modelos experimentais de artrite induzida por endotoxinas (HAWKINS et al., 1993) os níveis de TNF- α alcançaram o pico após 1-2 horas da aplicação. Billinghamurst, Fretz e Gordon (1995) analisaram a concentração de TNF- α no líquido sinovial de cavalos de corrida com doença articular degenerativa, secundária à presença de fragmento osteocondral, após 2, 12 e 26 horas do término da corrida. O resultado encontrado foi um aumento significativo nos níveis de TNF- α , com o pico ocorrendo às 12 horas e permanecendo elevado até às 26 horas. Concluíram que este prolongado aumento na concentração do mediador foi ocasionado pela contínua estimulação do exercício.

A prostaglandina E₂ (PGE₂) é o mediador inflamatório mais importante encontrado durante uma inflamação articular (HARDY et al., 1998). Nas primeiras 12 horas, o fluido inflamatório contém PGE₂, 6-keto-PGF₁ α , tromboxano B₂ e leucotrieno B₄, mas após 24 horas do insulto, somente a PGE₂ permanece em quantidades significativas (GIBSON; HODGE; WHITTEM, 1996).

A PGE₂ pode ser liberada das células sinoviais e dos condrócitos e está associada com as injúrias articulares, diminuindo a síntese de proteoglicanos pelos condrócitos e acelerando a perda de glicosaminoglicanos pela cartilagem articular (GIBSON; HODGE; WHITTEM, 1996). Os sinoviócitos e os condrócitos equinos secretam mais PGE₂ do que PGE₁, onde a

primeira tem um efeito direto sobre os sinoviócitos, causando a liberação de outros mediadores (HARDY et al., 1998). A liberação de prostaglandina pode ser induzida pelo dano celular, pela distensão vascular ou pela ação da IL-1 (BERTONE; PALMER; JONES, 2001). A síntese de PGE₂ pode aumentar sob a ação do TNF- α e do trauma, além da IL-1, induzindo então à destruição da cartilagem articular (MARTEL-PELLETIER; PELLETIER; FAHMI, 2003).

Rechenberg et al (2000) analisaram a produção de PGE₂ em culturas de células de membrana sinovial e cartilagem articular de eqüinos com osteoartrite e observaram aumento deste mediador nas articulações com sinais moderados de osteoartrite, principalmente na membrana sinovial. Nos casos mais severos de osteoartrite foi encontrado uma membrana sinovial fibrótica, inativa, com produção diminuída de PGE₂.

Frisbie et al (2003), utilizando modelo experimental, demonstraram a habilidade de alguns marcadores inflamatórios em diferenciar as alterações provocadas pelo exercício e as mudanças patológicas da osteoartrite. Segundo Thonar (1999) a identificação destes marcadores biológicos permitiu selecionar os indivíduos mais propensos a desenvolver uma destruição severa articular, instituindo assim terapia mais agressiva.

2.4 EXAMES RADIOGRÁFICOS E ULTRA-SONOGRÁFICOS

Com a persistência do processo inflamatório e degradativo articular, ou nos traumas externos, há danos estruturais detectáveis aos meios físicos de auxílio diagnóstico. Dentre eles estão os exames radiográficos e ultra-sonográficos (McILWRAITH, 1994).

A radiografia é o método de diagnóstico por imagem não invasivo mais utilizado na avaliação das claudicações dos eqüinos, sendo seu papel mais importante o de fornecer informações sobre as condições das estruturas ósseas e articulares (DYSON, 2003). Em

pacientes humanos com osteoartrite e artrite reumatóide o exame radiográfico das articulações, associado à avaliação física, permite também realizar o acompanhamento dos resultados da terapia medicamentosa, como relatado em alguns trabalhos (ROVATI, 1999; VIGNON et al., 1999).

Hopper et al. (2004) examinaram no período de um ano 106 cavalos atletas, em início de treinamento, utilizando o exame radiográfico da articulação intercárpica para avaliação do desenvolvimento de esclerose subcondral, e concluíram que quanto maior o grau de esclerose maior a probabilidade dos animais apresentarem sinais clínicos de claudicação em algum momento da carreira esportiva. O exame radiográfico seqüencial mostrou-se útil na monitorização da ocorrência de esclerose óssea durante o treinamento esportivo (HOPPER et al., 2004). Rovati (1999) relatou que o estudo radiográfico de uma articulação é a técnica de imagem mais econômica e facilmente disponível na avaliação das mudanças estruturais que ocorrem na osteoartrite.

As conseqüências das alterações metabólicas dos tecidos articulares podem ser extraídas da extensão da reabsorção, crescimento ósseo e esclerose subcondral visualizadas na imagem radiográfica, sendo necessário a perda de 30 a 50% da substância óssea para que a osteólise seja observada radiograficamente, indicando doença articular em estágio avançado (TODHUNTER, 1992).

As manifestações radiográficas das doenças articulares degenerativas ocorrem nas margens articulares, no osso subcondral e na cartilagem articular, representada pelo espaço articular, podendo preceder ou acompanhar os sintomas da doença (PARK; LEBEL, 1994). Trotter et al. (1982) observaram que as mudanças radiográficas iniciais podem indicar somente a proliferação óssea periarticular com a evidência de osteoartrite aparecendo mais tardiamente.

Neste aspecto, o exame ultra-sonográfico articular permite avaliar e acompanhar as alterações iniciais da osteoartrite, antes dos sinais radiográficos tornarem-se aparentes (RASERA, 2002). Comparada à radiografia a ultra-sonografia é um procedimento muito eficaz no diagnóstico de distensão por líquido no recesso sinovial e fornece informações precisas quanto às mudanças patológicas da membrana sinovial (DENOIX, 1998).

Ele permite avaliar a efusão e o espessamento periarticular, a proliferação das vilosidades sinoviais, as irregularidades na cartilagem articular resultantes de artrite e a ruptura de ligamentos articulares (DIK, 1990). Além disso, a ultra-sonografia parece ser mais sensível do que a radiografia para a identificação de osteófitos e remodelamento periarticular nas fases iniciais da doença articular (DENOIX, 1996). Com a ultra-sonografia pode-se avaliar todos os tecidos articulares (DENOIX et al., 1996), com especial detalhamento das mudanças que ocorrem na cápsula (SALLES-GOMES, 2001) e cartilagem articular (DENOIX, 1998; TOMLINSON; REDDING; SAGE, 2000).

As irregularidades na camada superficial da cartilagem articular contribuem significativamente para o comportamento mecânico desta cartilagem, sendo importante para a função normal do tecido (SAARAKKALA et al., 2004). Muitos métodos de avaliação desta cartilagem estão disponíveis somente em condições laboratoriais. A visualização da cartilagem no exame ultra-sonográfico mostrou ser um indicador sensível da degeneração quimicamente induzida da osteoartrite (NIEMINEN; TOYRAS; RIEPPO, 2002). Naredo et al. (2005) demonstraram a eficácia do exame ultra-sonográfico na avaliação da osteoartrite em pacientes humanos, comparando e associando os resultados com o exame radiográfico, e propondo a utilização deste meio diagnóstico para a monitorização das anormalidades peri-articulares e intra-articulares envolvidas na fisiopatogenia da osteoartrite.

Assim sendo, a possibilidade de se detectar a efusão articular e a visualização direta da cartilagem articular, meniscos e membrana sinovial através do exame ultra-sonográfico,

permite a detecção precoce dos achados patológicos envolvidos na sinovite, os quais estarão representados mais tardiamente na imagem radiográfica (KARIM et al., 2004).

3 OBJETIVOS

Avaliar, através de exames laboratoriais, ultra-sonográficos e radiográficos, o efeito da prática de esporte sobre as articulações metacarpofalangeanas de eqüinos atletas, identificar precocemente processos inflamatórios articulares provocados pelo exercício em cavalos jovens em início de treinamento, bem como analisar o comportamento da articulação adaptada ao treinamento intenso em cavalos ambientados com a vida esportiva.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o exame físico do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas por meio da avaliação da coloração, aspecto, qualidade do precipitado de mucina e registrar o volume obtido no momento da coleta.

Realizar a contagem total e diferencial das células nucleadas presentes no líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas.

Quantificar as concentrações de proteína total, glicose, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e prostaglandina E₂ (PGE₂) presente no líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas.

Realizar a avaliação semiquantitativa da marcação da imunocitoquímica para os receptores de TNF- α tipo II (TNFRII), nas células do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas.

Realizar a avaliação radiográfica, ultra-sonográfica e mensurar o grau de flexão das articulações metacarpofalangeanas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram estudadas 40 articulações metacarpofalangeanas de 20 eqüinos atletas, machos ou fêmeas, com idade entre 4 e 14 anos, que obrigatoriamente praticavam a mesma modalidade esportiva e estavam submetidos ao mesmo esquema e ritmo de treinamento, porém, em estágios diferentes. Estes atletas estavam sob o mesmo manejo nutricional e sanitário, sendo descartados os que possuíam histórico de afecções articulares. Particularmente foram acompanhados os cavalos em início de treinamento e os titulares de um time de pólo, alojados no mesmo haras na cidade de Indaiatuba / São Paulo.

Estes animais recebiam treinamento 6 dias por semana, descansando no sétimo dia, quando então eram coletados os dados para o experimento. Este esquema de treinamento é anual, sendo que os animais recebiam um mês de férias ao ano.

Optou-se por trabalhar com estes atletas, pois a osteoartrite da articulação metacarpofalangeana é a afecção articular mais comum dos cavalos de pólo (WOLLENMAN et al., 2003), provavelmente devido ao alto impacto que sofrem os membros torácicos durante a recepção do movimento, onde se percorre grandes distâncias em alta velocidade seguida de parada brusca.

Doze animais formaram o grupo de eqüinos jovens, ou seja, eqüinos em início de treinamento esportivo, sendo que este grupo foi subdividido em grupo controle (6 animais em início de treinamento esportivo, sem participação em torneios de pólo, perfazendo 12 articulações) e grupo 1 (6 animais em início de treinamento esportivo, com participação em torneios de pólo há 1 ano, resultando em 12 articulações), e os 8 restantes (16 articulações)

formaram o grupo dois (G2), caracterizado por equinos adultos, atletas, que estavam recebendo treinamento regular e participando de competições há 5 anos.

4.2 AVALIAÇÃO FÍSICA

4.2.1 Avaliação Semanal

Foi realizado, semanalmente, o exame das articulações metacarpofalangeanas através da inspeção e palpação das estruturas que as compõem, bem como a graduação de claudicação (STASHAK, 2002), durante todo o período experimental.

4.2.2 Mensuração da Circunferência Articular

Realizou-se a mensuração da circunferência articular das articulações metacarpofalangeanas (cm) em sua porção média, com o uso de uma fita métrica antes do início do experimento, dia 0, e nos dias 40, 80, 240, 280 e 360, para os animais do grupo controle, e nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360, para os animais dos grupos 1 e 2.

4.3 COLETA DE SANGUE

Foram coletadas amostras de 5,0 mL de sangue da veia jugular e acondicionadas em tubos contendo EDTA¹ com fluoreto de sódio, para as dosagens de proteína total e glicose plasmáticas. As amostras foram processadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

4.3.1 Dosagem da Proteína Total Plasmática

A dosagem da proteína total foi realizada pelo método do biureto com a utilização do analisador bioquímico automático², após a centrifugação da amostra.

4.3.2 Dosagem da Glicose Plasmática

As taxas de glicose plasmática foram determinadas com a utilização de reagente específico³ no analisador bioquímico automático, após a centrifugação da amostra.

4.4 COLETA DE LÍQUIDO SINOVIAL

Foram coletadas amostras de líquido sinovial de ambas articulações metacarpofalangeanas dos animais, e o volume registrado no momento da colheita. O acesso

¹ EDTA - Synte

² Analisador bioquímico automático – MAS – Liasys.

³ Glucose GOD FS – DiaSys.

escolhido para a artrocentese foi através do ligamento sesamoideano colateral lateral, segundo técnica descrita por Misheff e Stover (1991), utilizando agulhas hipodérmicas 25 x 8⁴. O local de punção das articulações metacarpofalangeanas foi preparado assepticamente antes de cada colheita, com o uso de iodopovidona e álcool 70%. As amostras foram processadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

4.4.1 Análise Física do Líquido Sinovial

O líquido sinovial foi analisado quanto à coloração, sendo classificado como amarelo claro, amarelo ouro e vermelho; e quanto ao aspecto, como límpido, semiturvo e turvo, recebendo escores de 1 a 3 para cada característica analisada.

4.4.2 Teste do Precipitado de Mucina

Para a análise da qualidade do precipitado de mucina, 0,5 mL do líquido sinovial colhido foi acondicionado em tubos sem anticoagulante e centrifugado durante 10 minutos a 100 x g. Ao sobrenadante, 2 mL de ácido acético a 2% foi adicionado e, após homogeneização com bastão de vidro, o grumo formado foi classificado como bom, regular, ruim e muito ruim, recebendo, respectivamente, os seguintes escores: 1, 2, 3 e 4 (VAN PELT, 1974).

⁴ Agulha descartável BD – PrecisionGlide.

4.4.3 Contagem Total e Diferencial das Células do Líquido Sinovial

Para a contagem total de células nucleadas, acondicionou-se 1,0 mL de líquido sinovial em tubos contendo EDTA. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 100 x g e o sedimento ressuspenso em 1,0 mL de PBS (solução tampão de fosfato), realizando a contagem em câmara de Neubauer⁵. Em seguida foram confeccionados os esfregaços, corados com Metanol-May Grunwald-Giemsa, para a contagem diferencial dos leucócitos.

4.4.4 Dosagem da Proteína Total do Líquido Sinovial

Para as dosagens de proteína total utilizou-se o sobrenadante retirado após centrifugação da amostra destinada à contagem total de células nucleadas. As dosagens da proteína total foram realizadas pelo método do biureto com a utilização do analisador bioquímico automático.

4.4.5 Dosagem da Glicose do Líquido Sinovial

As amostras destinadas à dosagem de glicose foram acondicionadas em tubos contendo fluoreto de sódio. Determinou-se a taxa de glicose do líquido sinovial por meio da utilização de reagente específico no analisador bioquímico automático, após a centrifugação da amostra.

⁵ Neubauer – Hirschmann – EM - Techcolor

4.4.6 Determinação da IL-1 do Líquido Sinovial

Para a quantificação da IL-1 utilizou-se 0,5 mL de líquido sinovial acondicionado em tubo estéril sem anticoagulante. A IL-1 foi determinada baseado no método de ELISA *sandwich* com marcação dupla de anticorpos. A placa de ELISA foi sensibilizada com um anticorpo monoclonal específico de captura para IL-1 β . Este anticorpo irá se ligar ao IL-1 presente na amostra que é introduzida na placa. Após a sensibilização da placa foram adicionados 100 μ L da amostra em duplicata, e 100 μ L do anticorpo de detecção. Após incubação *overnight* a 4°C a placa foi lavada 5 a 6 vezes com o reagente de Ellman, diluído em água ultra pura. A absorbância da amostra foi lida entre 405 e 420nm em um leitor de ELISA correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 3,9 a 7,8 pg/mL.

As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

4.4.7 Determinação da PGE₂ do Líquido Sinovial

A concentração de PGE₂ foi determinada segundo o método descrito por Pradelles, Grassi e Maclouf (1995). A absorbância da amostra foi lida à 450 nm em um leitor de ELISA correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 10 a 5000 pg/mL.

As análises foram realizadas no Laboratório de Imunologia do Departamento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

4.4.8 Determinação do TNF- α do Líquido Sinovial

Para a quantificação do TNF- α utilizou-se 0,5 mL de líquido sinovial acondicionado em tubos sem anti-coagulante. Esta quantificação foi realizada através de um ensaio de citotoxicidade “in vitro” sobre células L929 descrito por Flick e Gifford (1984).

Para o controle negativo adicionou-se às células L929 apenas meio RPMI 1640 completo e como controle positivo, em quadruplicatas, foram adicionadas concentrações previamente conhecidas de TNF α a saber: 85-30-10-3-1-0,33-0,11-0,037-0,012-0,004 ng de TNF α /100 μ L solução de RPMI 1640 completo, de modo a permitir a obtenção de uma curva padrão.

Os resultados obtidos após a leitura, foram expressos em densidade óptica (DO), sendo transformados em ng/mL, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão. A porcentagem de lise foi calculada através da seguinte fórmula:

$\% \text{ de lise} = [1 - (A \text{ amostra} / A \text{ controle})] \times 100$, onde:

- A amostra = absorbância obtida em uma determinada diluição da amostra.
- A controle = absorbância obtida no controle.

As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

4.4.9 Técnica de Imunocitoquímica

As células do líquido sinovial foram centrifugadas em uma *Citospin* para obtenção de um botão celular. O botão celular foi fixado em acetona gelada por 30 minutos. Logo após foram submetidas, durante 45 min, em ambiente protegido da luz, a um tratamento para

inibição da peroxidase endógena tecidual com solução de metanol e água destilada (1:2) adicionada de 1% de peróxido de hidrogênio. Fez-se o bloqueio da avidina/ biotina em câmara úmida na estufa a 37°C e bloqueio de sítios inespecíficos com bloqueador de proteínas⁶. Em seguida foram removidos os excessos sobre o botão celular e iniciado o processo de incubação com anticorpo primário anti-TNF II (receptor do tipo II), o qual realizou-se em câmara úmida, por 12 horas, em temperatura de 4° C. Após nova lavagem em solução tampão foi incubado o anticorpo secundário diluído em PBS/BSA (1%) por 1 hora. Em seguida, após a lavagem com solução tampão procedeu-se a incubação com avidina/biotina, por 30 minutos, em temperatura ambiente. Antes da fase final, de revelação, as lâminas foram lavadas duas vezes em SST.

Durante a revelação realizada com a diaminobenzina, em solução a 0,03% acrescida de 0,03% de peróxido de hidrogênio, o material permaneceu em ambiente de baixa luminosidade.

O tempo de revelação variou de 1 a 3 minutos. Para interromper a reação as lâminas foram lavadas em água destilada. A contra-coloração realizou-se com Hematoxilina de Harris diluída a 1:2 em água destilada durante 30 segundos. Posteriormente fez-se a lavagem em água corrente por 15 minutos. Em seguida o material foi desidratado em solução crescente de álcool xilol, e colado a lamínula com bálsamo do Canadá.

Análise da Imunocitoquímica:

Para a análise de imagem das marcações positivas ou negativas utilizou-se um Microscópio Olympus com processador de imagem IMAGE PRO PLUS instalado em computador P 3700 com placa processadora PENTIUM. As imagens foram examinadas com um aumento de 40X e transmitidas para o computador onde se determinou um escore para a marcação positiva dos receptores de TNF tipo II.

⁶ Protein Block-Kit, DAKO Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA.

Para análise semi-quantitativa da marcação da imunocitoquímica foram contadas o total de 200 células (100%) do líquido sinovial utilizando os seguintes critérios (BERGQVIST; FERNÖ; SKOOG, 1997):

- 1- Quanto à extensão de marcação, ou seja, a frequência de células marcada foi considerada: 0= ausente; 1 - menor do que 1%; 2 - de 1-10%; 3 - de 10-33%; 4 - de 33-66% e 5 – maior que 66%.
- 2- Quanto à intensidade de marcação foi considerado 0 = ausente; 1 = marcação discreta; 2 = marcação moderada e 3 = marcação acentuada.

O índice de marcação específica expresso como escore total de marcação (ETM) foi obtido considerando a soma dos escores de frequência e de intensidade.

Documentação fotográfica:

Foram obtidas fotomicrografias das lâminas coradas por HE e pelo método de imunocitoquímica, com o auxílio de um Fotomicroscópio (Olympus) equipado com câmera fotográfica de 35 mm e filme Kodacolor Gold 100.

As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

4.5 EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO

Realizou-se o exame ultra-sonográfico de ambas as articulações metacarpofalangeanas, nos planos longitudinais (sagital dorsal, lateral e medial) e transversais (dorsal, lateral e medial), segundo técnica descrita por Denoix (1996).

As imagens ultra-sonográficas foram avaliadas fixando-se escores, utilizando uma escala de 1 a 3, para cada uma dos seguintes critérios:

- Homogeneidade da cápsula articular, dos ligamentos colaterais (lateral e medial) e dos ramos do ligamento suspensor do bolete.
- Contorno da silhueta óssea no ponto de inserção do ligamento suspensor do bolete nos ossos sesamóides proximais, medial e lateral; e na inserção dos ligamentos colaterais, medial e lateral, no terceiro osso metacarpiano e primeira falange.
- Acúmulo de líquido intra-articular.
- Perfil da silhueta óssea da articulação metacarpofalangeana.
- Contorno da silhueta óssea dos ossos sesamóides proximais, no aspecto palmar.

Além disso, realizou-se a mensuração da espessura da cápsula articular dorsal em plano longitudinal e transversal e do ligamento anular.

Utilizou-se um aparelho de ultra-sonografia Aloka 900⁷, com transdutor linear de 7,5 MHz, gel de contato Multi gel. As imagens e os valores das mensurações foram impressas em papel térmico⁸, utilizando-se vídeoimpressora⁹.

4.6 EXAME RADIOGRÁFICO

Foram realizadas as projeções radiográficas dorsopalmar, lateromedial, dorsomedial-palmarolateral 45° oblíqua e dorsolateral-palmaromedial 45° oblíqua, de ambas articulações metacarpofalangeanas. A avaliação das imagens radiográficas foi realizada fixando-se escores, usando uma escala de 0 a 5, segundo Kirker-Head et al. (2000), para cada um dos seguintes critérios:

⁷ Aloka SSD-900

⁸ Sony

⁹ Sony UP 701

- aumento de volume dos tecidos moles peri-articulares.
- aumento ou diminuição do espaço articular.
- presença de osteófitos e entesiófitos.
- esclerose do osso subcondral.
- mudanças erosivas articulares e evidências de fragmentos osteocondrais.

Foi realizada uma projeção flexionada latero-medial com a flexão total da articulação para mensurar o ângulo de flexão, segundo técnica descrita por Strand et al. (1995). Foram traçadas, nestas imagens radiográficas, duas linhas, uma passando pelo centro do terceiro osso metacarpiano e outra pela falange proximal. Utilizando-se a intercessão destas duas linhas sobre a articulação metacarpofalangeana, foi determinado o ângulo palmar entre o terceiro osso metacarpiano e a falange proximal quando em máxima flexão.

Os exames radiográficos foram realizados com o uso de um aparelho de raios-x semi portátil¹⁰, fornecido pelo Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP, sendo as unidades de exposições determinadas levando-se em consideração a região do corpo e a sua espessura. A distância foco-filme manteve-se fixa e as películas radiográficas (24x30 cm), foram usadas com chassis rígidos e compostos por telas intensificadoras rápidas com emissão de luz verde. As películas radiográficas expostas à radiação foram identificadas e posteriormente submetidas ao processo de revelação automático.

4.7 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

¹⁰ Min Xray, modelo HF 100

efeito de grupos e momentos, seguido pelo teste de Tukey-Kramer. Parâmetros subjetivos, para os quais se atribuíram escores numéricos, foram estudados empregando-se análise de variância não paramétrica, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $P < 0,05$.

4.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.8.1 Experimento 1 - Acompanhamento radiográfico, ultra-sonográfico e laboratorial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 (G1) e grupo 2 (G2)

Foram utilizadas 12 articulações metacarpofalangeanas de eqüinos, jogadores de pólo com idade entre quatro e cinco anos, em fase inicial de treinamento, constituindo o grupo controle. O grupo 1 (G1) foi composto por 12 articulações metacarpofalangeanas de eqüinos também com idade entre 4 e 5 anos mas que já estavam participando das competições, e o grupo 2 (G2) por 16 articulações metacarpofalangeanas de eqüinos, jogadores de pólo com idade entre oito e 14 anos, em treinamento intenso, que participavam dos torneios de pólo há cinco anos. Os animais foram examinados semanalmente (item 4.2.1) e mensalmente (item 4.2.2) durante todo o período experimental. Realizou-se o exame ultra-sonográfico das articulações metacarpofalangeanas de acordo com a técnica descrita no item 4.5 nos dias zero, 210 e 360. O exame radiográfico das articulações metacarpofalangeanas foi realizado de acordo com a técnica descrita no item 4.6, nos dias zero, 210 e 360 para os animais do grupo controle e nos dias zero, 120, 210 e 360 para os animais dos grupos 1 e 2.

A coleta do líquido sinovial foi realizada segundo a técnica descrita no item 4.4, para a realização das seguintes análises: análise física (item 4.4.1), teste da qualidade do precipitado de mucina (item 4.4.2), contagem total e diferencial das células do líquido sinovial (item 4.4.3), dosagem das proteínas totais (item 4.4.4), dosagem da glicose (item 4.4.5), quantificação dos níveis de IL-1 (item 4.4.6) e PGE₂ (item 4.4.7) e determinação do TNF- α (item 4.4.8), 24 horas após o término do treinamento, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360 nos animais do grupo controle e nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360 nos animais dos grupos 1 e 2. As dosagens de proteína total (item 4.4.4) e glicose plasmáticas (item 4.4.5) foram realizadas nos dias zero, 240 e 360 para os animais do grupo controle, e nos dias zero, 160, 200, 240, 280, 320 e 360 nos grupos 1 e 2. A imunocitoquímica para marcação dos receptores de TNF tipo II (item 4.4.9) foi realizada nos dias zero, 80, 240 e 360, em todos os grupos.

Durante todo o período experimental foram acompanhadas as alterações clínicas que ocorreram nos animais, em decorrência da prática esportiva, e as modificações no manejo e tratamento registradas.

4.8.2 Experimento 2 – Avaliação do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais em treinamento intenso imediatamente após exercício.

Foram utilizadas 8 articulações metacarpofalangeanas de equínos, jogadores de pólo, com idade entre oito e 14 anos, em treinamento intenso, que participavam dos torneios de pólo há cinco anos.

O líquido sinovial (item 4.4) das articulações metacarpofalangeanas foi coletado antes do exercício (momento zero) e 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. As amostras

colhidas foram submetidas às seguintes análises: análise física (item 4.4.1), contagem total e diferencial das células do líquido sinovial (item 4.4.3), dosagem da proteína total (item 4.4.4), dosagem da glicose (item 4.4.5), quantificação dos níveis de IL-1 (item 4.4.6) e PGE₂ (item 4.4.7) e determinação do TNF- α (item 4.4.8). A imunocitoquímica para marcação dos receptores de TNF tipo II (item 4.4.9) foi realizada às 3 e 6 horas após o término do jogo de pólo.

5. RESULTADOS

5.1 Experimento 1 - Acompanhamento radiográfico, ultra-sonográfico e laboratorial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 (G1) e grupo 2 (G2).

5.1.1 Avaliação Física

5.1.1.1 Avaliação Semanal

Durante a avaliação semanal nenhum animal apresentou alterações no exame físico das articulações metacarpofalangeanas, no período analisado.

5.1.1.2 Mensuração da Circunferência Articular

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos valores da circunferência articular (cm) nos diferentes dias dentro do mesmo grupo. Comparando-se os grupos em um mesmo dia observou-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 2 no 360º dia ($26,58 \pm 0,76$ e $28,07 \pm 1,12$; $P < 0,01$), e entre o grupo 1 e o grupo 2 nos dias 40 ($26,66 \pm 0,53$ e $27,96 \pm 1,31$; $P < 0,01$), 80 ($26,37 \pm 0,48$ e $27,75 \pm 1,19$; $P < 0,01$), 120 ($26,58 \pm 0,66$ e $27,75 \pm 0,85$; $P < 0,01$) e 280 ($26,37 \pm 0,80$ e $27,62 \pm 1,51$; $P < 0,05$) (Figura 1). Comparando-se as médias finais dos 3 grupos, houve diferença significativa ($P < 0,001$) do grupo 2 ($27,67 \pm 0,23$) em relação ao grupo controle ($26,94 \pm 0,27$) e grupo 1 ($26,83 \pm 0,33$) (Apêndice A e Figura 2).

Figura 1 – Valores médios da circunferência articular (cm) das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

Figura 2 – Valores médios finais da circunferência articular (cm) das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

5.1.2 Dosagem da Proteína Total Plasmática

Os dados referentes à concentração de proteína total plasmática (g/dL) dos animais dos três grupos encontram-se no apêndice A não havendo diferença significativa ($P>0,05$) entre os dias de coleta no mesmo grupo, ou entre os grupos.

5.1.3 Dosagem da Glicose Plasmática

Os resultados referentes à concentração de glicose plasmática (mg/dL) dos animais dos três grupos encontram-se no apêndice B não havendo diferença significativa ($P>0,05$) entre os dias de coleta no mesmo grupo, ou entre os grupos.

5.1.4 Coleta de Líquido Sinovial

As coletas do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas (Figura 3) não ocasionaram reações adversas e não interferiram com o desempenho dos animais durante todo o torneio de pólo. O local da coleta foi de fácil manipulação e ocasionou pouca contaminação sangüínea da amostra.

Figura 3 – Foto demonstrando o local da punção da articulação metacarpofalangeana e a aquisição da amostra de líquido sinovial. São Paulo, 2007

5.1.5 Análise do Líquido Sinovial

5.1.5.1 Coloração do Líquido Sinovial

O líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo 2 apresentaram escore 2, ou seja, coloração amarelo ouro, em 49,37% das amostras, sendo estatisticamente diferente ($P < 0,05$) das amostras obtidas dos animais do grupo controle e grupo 1, cujo escore foi 1 (coloração amarelo palha) em 79,51% e 59,22% das amostras respectivamente (Apêndice B).

Quando se comparou cada grupo individualmente nos diferentes dias o líquido sinovial coletado no 280º dia dos animais do grupo 2 apresentou-se com coloração avermelhada (escore 3) em 56,25% das amostras, sendo estatisticamente diferente ($P < 0,05$)

em relação ao dia zero (Figura 4). O líquido sinovial dos animais do grupo controle e do grupo 1 não apresentaram alterações significativas no decorrer do período experimental.

Figura 4 – Foto demonstrando as diferentes colorações do líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo 2. São Paulo, 2007

5.1.5.2 Aspecto do Líquido Sinovial

Os resultados referentes ao aspecto do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas estão demonstrados no apêndice C. O aspecto do líquido sinovial não alterou ($P>0,05$) no decorrer dos dias dentro de um mesmo grupo, e nem entre os grupos, mantendo-se com o aspecto límpido.

5.1.5.3 Teste do Precipitado de Mucina

Os resultados referentes ao teste do precipitado da mucina do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas encontram-se no apêndice C. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) na qualidade do precipitado de mucina entre os grupos analisados, com a maioria dos animais apresentando a formação de um grumo de boa qualidade no líquido sinovial. Comparando-se os diferentes dias dentro de um mesmo grupo a qualidade do precipitado da mucina no líquido sinovial dos animais do grupo 2 se alterou significativamente no 280º dia, onde o grumo formado foi de qualidade ruim em 42,85% das amostras.

5.1.5.4 Volume de Líquido Sinovial

Os dados referentes ao volume de líquido sinovial (mL) coletado das articulações metacarpofalangeanas encontram-se no apêndice D. Comparando-se as médias finais entre os três grupos pode-se observar uma diferença significativa ($P<0,001$) na quantidade obtida de líquido sinovial (mL) das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo 2 ($5,38\pm0,60$) em relação aos animais do grupo controle ($4,01\pm0,92$) e do grupo 1 ($3,47\pm0,95$) (Figura 5). Comparando-se as médias nos diferentes dias dentro de cada grupo houve um aumento de volume significativo somente nos animais do grupo 1 entre o 80º dia ($2,47\pm0,65$) e o 320º dia ($4,67\pm1,23$; $P<0,05$); e entre o 120º dia ($2,0\pm1,02$) com o 320º dia ($4,67\pm1,23$; $P<0,01$) e o 360º dia ($5,09\pm2,99$; $P<0,05$).

Comparando-se os três grupos no mesmo dia verificou-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 2 nos dias zero ($2,92 \pm 1,18$ e $4,78 \pm 0,81$; $P < 0,001$) e 40° ($3,12 \pm 1,43$ e $4,81 \pm 0,74$; $P < 0,05$); e entre o grupo 1 e grupo 2 nos dias zero ($3,66 \pm 1,30$ e $4,78 \pm 0,81$; $P < 0,05$), 40 ($3,1 \pm 1,85$ e $4,81 \pm 0,74$; $P < 0,05$), 80 ($2,47 \pm 0,65$ e $4,37 \pm 0,94$; $P < 0,05$), 120 ($2,0 \pm 1,02$ e $5,17 \pm 0,75$; $P < 0,0001$), 200 ($3,60 \pm 1,47$ e $5,45 \pm 2,03$; $P < 0,05$), 240 ($3,38 \pm 1,31$ e $5,89 \pm 2,24$; $P < 0,01$) e 280 ($2,83 \pm 1,52$ e $5,71 \pm 2,63$; $P < 0,01$) (Figura 6).

Figura 5 – Valores médios finais do volume (mL) de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

Figura 6 – Valores médios do volume (mL) de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

5.1.5.5 Contagem Total e Diferencial das Células do Líquido Sinovial

Os resultados referentes à contagem total de células nucleadas (cél/s/μL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas encontram-se no apêndice D.

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) na contagem total de células nucleadas do líquido sinovial quando as médias finais entre os três grupos foram comparadas (Figura 7). Em relação aos diferentes dias dentro de cada grupo houve aumento significativo ($P < 0,05$) no 240º dia ($274,37 \pm 344,85$) em relação ao 120º dia ($60,00 \pm 48,16$) no grupo 2 (Figura 8).

Figura 7 – Valores médios finais da contagem total de células nucleadas (células/μL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

Figura 8 – Valores médios da contagem total de células nucleadas (células/μL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

Na análise citológica do líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas observou-se neutrófilos, linfócitos, monócitos, macrófagos e sinoviócitos, demonstrados nos apêndices E a G. A porcentagem relativa de neutrófilos (%) não diferiu significativamente

($P>0,05$) em relação aos grupos controle, 1 e 2, nos dias analisados. Em relação aos diferentes dias dentro de cada grupo houve uma diferença significativa ($P<0,001$) no grupo controle entre o dia 240 ($4,66\pm2,77$) com os dias zero ($24,60\pm11,37$), 40 ($29,50\pm6,19$) e 80 ($33,37\pm18,98$). No grupo 1 houve diferença significativa ($P<0,05$) entre o 80º dia ($25,16\pm18,62$) e o dia 240 ($5,75\pm6,59$). No grupo 2 houve diferença significativa ($P<0,001$) entre os dias 160 ($3,68\pm4,70$) com os dias 80 ($22,00\pm16,60$; $P<0,001$) e 320 ($17,26\pm5,49$; $P<0,001$); e entre dia 320 com os dias 200 ($9,31\pm14,11$; $P<0,05$) e 240 ($6,86\pm5,78$; $P<0,05$). Comparando-se os três grupos no mesmo dia observou-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 2 nos dias zero ($24,60\pm11,37$ e $13,25\pm17,48$; $P<0,05$) e 40 ($29,50\pm6,19$ e $10,85\pm9,75$; $P<0,01$); entre o grupo controle e o grupo 1 nos dias 40 ($29,50\pm6,19$ e $11,50\pm3,23$; $P<0,05$) e 360 ($9,58\pm1,88$ e $5,41\pm2,93$; $P<0,05$); e entre o grupo 1 e o grupo 2 no 320º dia ($6,08\pm7,37$ e $17,56\pm5,44$; $P<0,001$) (Figura 9).

Figura 9 – Valores médios da porcentagem (%) de neutrófilos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

A porcentagem de linfócitos (%) diferiu significativamente ($P<0,01$) entre o grupo controle ($50,38\pm9,11$) e o grupo 1 ($44,11\pm7,18$) quando se comparou a média final entre os grupos (Figura 10). Houve diferença significativa ($P<0,01$) entre o 80º dia ($34,14\pm6,71$) e o 240º dia ($59,50\pm16,26$) no grupo controle e entre os dias 40 ($32,07\pm18,04$) e 80 ($35,50\pm9,03$) com os dias 120 ($56,81\pm7,20$; $P<0,01$), 200 ($54,81\pm18,77$; $P<0,01$) e 240 ($55,71\pm10,39$; $P<0,05$) no grupo 2. Quando se comparou os três grupos no mesmo dia houve diferença significativa entre o grupo controle ($59,16\pm4,93$) e o grupo 1 ($41,45\pm13,82$; $P<0,01$) no dia 360, e o grupo 2 nos dias 40 ($53,25\pm8,73$ e $32,07\pm18,04$; $P<0,05$) e 280 ($58,08\pm5,53$ e $47,81\pm8,46$; $P<0,05$). Entre os grupos 1 e 2 houve diferença significativa nos dias 40 ($47,66\pm7,82$ e $32,07\pm18,04$; $P<0,05$), 200 ($39,90\pm18,24$ e $54,81\pm18,77$; $P<0,05$) e 280 ($59,25\pm10,55$ e $47,81\pm8,46$; $P<0,05$) (Figura 11).

Figura 10 – Valores médios finais da porcentagem (%) de linfócitos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

Figura 11 – Valores médios da porcentagem (%) de linfócitos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

Em relação aos monócitos (%) houve diferença significativa ($P < 0,01$) entre os dias 40 ($1,75 \pm 0,50$) e 240 ($33,25 \pm 13,01$) no grupo controle, e entre o dia 40 ($50,28 \pm 10,16$) e os dias 120 ($25,93 \pm 9,29$; $P < 0,01$), 160 ($32,75 \pm 12,58$; $P < 0,05$), 200 ($30,93 \pm 12,94$; $P < 0,01$), 240 ($30,28 \pm 7,74$; $P < 0,01$), 320 ($27,31 \pm 5,33$; $P < 0,001$) e 360 ($31,15 \pm 9,72$; $P < 0,05$) no grupo 2. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na porcentagem de monócitos entre os grupos controle, 1 e 2, nos dias analisados. Em relação aos três grupos no mesmo dia houve diferença significativa entre o grupo controle com o grupo 1 nos dias zero ($23,20 \pm 6,30$ e $38,00 \pm 8,12$; $P < 0,05$) e 360 ($30,25 \pm 5,51$ e $43,63 \pm 8,88$; $P < 0,01$), e com o grupo 2 no dia 40 ($1,75 \pm 0,50$ e $50,28 \pm 10,16$; $P < 0,001$). Entre os grupos 1 e 2 houve diferença significativa nos dias 40 ($36,33 \pm 6,40$ e $50,28 \pm 10,16$; $P < 0,05$), 320 ($31,91 \pm 10,93$ e $27,31 \pm 5,33$; $P < 0,05$) e 360 ($43,63 \pm 8,88$ e $31,15 \pm 9,72$; $P < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12 – Valores médios da porcentagem (%) de monócitos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

Foi observada diferença significativa na porcentagem de macrófagos entre o grupo controle ($1,00 \pm 0,89$) e os grupos 1 ($2,89 \pm 2,63$; $P < 0,001$) e 2 ($2,69 \pm 1,96$; $P < 0,01$), nos dias analisados (Figura 13). No valor relativo dos macrófagos (%) houve diferença significativa no grupo 1 entre o dia 80 ($0,0 \pm 0,0$) e os dias 40 ($3,33 \pm 2,42$; $P < 0,05$), 240 ($6,75 \pm 7,91$; $P < 0,05$) e 320 ($8,08 \pm 6,55$; $P < 0,001$); e entre o dia 320 ($8,08 \pm 6,55$) e os dias 120 ($0,42 \pm 1,13$; $P < 0,01$), 200 ($1,20 \pm 2,30$; $P < 0,01$) e 280 ($1,33 \pm 1,82$; $P < 0,05$). O grupo 2 apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre o dia zero ($0,28 \pm 1,06$) com os dias 40 ($5,92 \pm 7,37$) e 160 ($5,06 \pm 7,75$). Comparando-se os três grupos no mesmo dia observou-se diferença significativa entre o grupo controle ($1,08 \pm 1,08$) e o grupo 2 ($4,06 \pm 2,72$; $P < 0,01$) no 280º dia. Os grupos 1 e 2 apresentaram diferença significativa nos dias zero ($2,58 \pm 1,92$ e $0,28 \pm 1,06$; $P < 0,01$), 280 ($1,33 \pm 1,82$ e $4,06 \pm 2,72$; $P < 0,01$) e 320 ($8,08 \pm 6,55$ e $0,87 \pm 1,02$; $P < 0,001$) (Figura 14).

Figura 13 – Valores médios finais da porcentagem (%) de macrófagos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

Figura 14 – Valores médios da porcentagem (%) de macrófagos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

A porcentagem de sinoviócitos (%) alterou significativamente entre o grupo controle ($1,40 \pm 1,42$) e os grupos 1 ($2,97 \pm 3,55$; $P < 0,01$) e 2 ($2,63 \pm 1,99$; $P < 0,001$) nos dias analisados

(Figura 15). Houve diferença significativa ($P<0,01$) entre o 40º ($4,00\pm4,35$) e o 240º dia ($0,08\pm0,28$) no grupo controle, entre o dia 240 ($12,33\pm9,93$) e os dias zero ($1,33\pm1,72$; $P<0,05$), 80 ($0,63\pm1,20$; $P<0,001$) e 160 ($0,20\pm0,44$; $P<0,01$) no grupo 1 e entre o 40º dia ($0,64\pm0,84$) e 360 ($0,61\pm0,86$) com os dias 80 ($4,64\pm4,61$; $P<0,05$) e 120 ($6,87\pm7,87$; $P<0,05$) no grupo 2. Comparando-se os três grupos no mesmo dia houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 1 nos dias 200 ($0,08\pm0,28$ e $12,33\pm9,93$; $P<0,001$) e 360 ($0,33\pm0,88$ e $3,63\pm2,87$; $P<0,001$); e com o grupo 2 nos dias 80 ($0,77\pm1,13$ e $4,64\pm4,61$; $P<0,05$) e 200 ($0,08\pm0,28$ e $2,92\pm2,64$; $P<0,05$). Entre os grupos 1 e 2 houve diferença significativa nos dias 80 ($0,63\pm1,20$ e $4,64\pm4,61$; $P<0,01$), 160 ($3,62\pm3,07$ e $0,20\pm0,44$; $P<0,01$) e 360 ($3,63\pm2,87$ e $0,61\pm0,86$; $P<0,01$) (Figura 16).

Figura 15 – Valores médios finais da porcentagem (%) de sinoviócitos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

Figura 16 – Valores médios da porcentagem (%) de sinoviócitos do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na porcentagem relativa (%) de eosinófilos entre os grupos controle, 1 e 2 nos dias analisados, e nem dentro de cada grupo nos diferentes dias.

As figuras 17, 18, 19, 20 e 21 ilustram algumas células nucleadas encontradas no exame citológico do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas.

Figura 17 – Foto ilustrando as células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº09 do grupo 1, no 40º dia. Sinoviócito (seta fina) e monócito (seta larga). (aumento 100X, imersão). São Paulo, 2007

Figura 18 – Foto ilustrando as células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº27 do grupo 2, no 80º dia. Sinoviócitos (setas). (aumento 40X). São Paulo, 2007

Figura 19 – Foto ilustrando as células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal n°07 do grupo 1, no 120° dia. Macrófago (seta). (aumento 100X, imersão). São Paulo, 2007

Figura 20 – Foto ilustrando as células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal n°02 do grupo controle, no 40° dia. Sinoviócito (seta maior) e neutrófilos (setas menores). (aumento 100X , imersão). São Paulo, 2007

Figura 21 – Foto ilustrando as células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº01 do grupo controle, no 40º dia. Linfócito (seta maior) e monócito (seta menor). (aumento 40X). São Paulo, 2007

5.1.5.6 Proteína Total do Líquido Sinovial

Os resultados referentes à dosagem da proteína total (g/dL) do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana encontram-se no apêndice H. Houve uma diferença significativa ($P < 0,001$) na média dos valores da proteína total (g/dL) do líquido sinovial entre o grupo controle ($0,87 \pm 0,13$) com os grupos 1 ($1,23 \pm 0,21$) e 2 ($1,26 \pm 0,31$) (Figura 22). O grupo 2 apresentou diferenças significativas ($P < 0,01$) entre o dia zero ($0,78 \pm 0,47$) e os dias 40 ($1,65 \pm 0,64$) e 120 ($1,56 \pm 0,43$); entre o 40º dia ($1,65 \pm 0,64$) e o 320º dia ($0,87 \pm 0,37$) e entre o 120º dia ($1,56 \pm 0,43$) com o 320º dia ($0,87 \pm 0,37$). O grupo controle e o grupo 1 não apresentaram diferenças significativas entre os dias.

Comparando-se os três grupos no mesmo dia observou-se diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo 1 nos momentos zero ($0,71 \pm 0,10$ e $1,01 \pm 0,18$) e

240 ($0,87\pm0,29$ e $1,46\pm0,55$), e entre o grupo controle com o grupo 2 nos momentos 40 ($0,88\pm0,25$ e $1,65\pm0,64$; $P<0,01$) e 240 ($0,87\pm0,29$ e $1,44\pm0,63$; $P<0,05$). Os grupos 1 e 2 diferiram nos dias 120 ($0,94\pm0,36$ e $1,56\pm0,43$; $P<0,001$) e 320 ($1,45\pm0,40$ e $0,87\pm0,37$; $P<0,01$) (Figura 23).

Figura 22 – Valores médios finais da proteína total (g/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

Figura 23 – Valores médios da proteína total (g/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

5.1.5.7 Glicose do Líquido Sinovial

Os resultados referentes à dosagem da glicose do líquido sinovial (mg/dL) das articulações metacarpofalangeanas encontram-se no apêndice H. Foi observado diferença significativa ($P>0,01$) nos níveis de glicose do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas do grupo controle ($87,70\pm10,77$) com os grupos 1 ($96,81\pm9,86$) e 2 ($94,68\pm9,85$) quando se comparou a média final entre eles (Figura 24).

Em relação aos diferentes dias dentro de cada grupo houve alteração significativa no grupo 1 entre os dias 40 ($96,80\pm9,09$) e o 360º dia ($73,60\pm10,30$; $P<0,01$), e o dia 240 ($102,54\pm15,37$) com os dias 280 ($78,90\pm6,89$; $P<0,001$) e 360 ($73,60\pm10,30$; $P<0,001$). Nos animais do grupo 2 houve diferença significativa entre o 280º dia ($81,06\pm6,57$) com os dias zero ($103,87\pm8,05$; $P<0,001$), 40 ($106,56\pm11,08$; $P<0,001$), 80 ($100,50\pm8,54$; $P<0,001$), 120 ($99,74\pm7,65$; $P<0,01$), 160 ($97,46\pm13,35$; $P<0,05$) e 200 ($97,93\pm15,21$; $P<0,05$); e entre o 320º dia com os dias zero ($103,87\pm8,05$; $P<0,001$), 40 ($106,56\pm11,08$; $P<0,001$), 80 ($100,50\pm8,54$; $P<0,001$), 120 ($99,74\pm7,65$; $P<0,001$), 160 ($97,46\pm13,35$; $P<0,001$), 200 ($97,93\pm15,21$; $P<0,001$) e 240 ($92,62\pm11,29$; $P<0,05$).

Comparando-se os três grupos no mesmo dia observou-se diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo 1 nos dias 240 ($102,54\pm15,37$ e $83,81\pm15,91$; $P<0,05$) e 360 ($73,6\pm10,3$ e $100,77\pm13,16$; $P<0,001$), e com o grupo 2 nos dias 80 ($87,33\pm9,05$ e $100,5\pm8,54$; $P<0,01$) e 360 ($73,60\pm10,3$ e $91,57\pm5,45$; $P<0,01$). Houve diferença significativa entre os grupos 1 e 2 nos dias 120 ($81,33\pm14,84$ e $99,75\pm7,65$; $P<0,05$) e 320 ($111,11\pm13,66$ e $75,43\pm5,30$; $P<0,05$) (Figura 25).

Figura 24 – Valores médios finais da glicose (mg/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

Figura 25 – Valores médios da glicose (mg/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

5.1.5.8 Concentração de IL-1 do Líquido Sinovial

Todos os valores obtidos da concentração de IL-1 (pg/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas, dos grupos controle, 1 e 2, estiveram abaixo dos valores da curva padrão dos kits de ELISA utilizados. Obtiveram-se somente as concentrações de IL-1 do líquido sinovial das articulações direita e esquerda do animal nº27, do grupo 02, no 320º dia, nos valores de 10,53 pg/mL e 3,63 pg/mL, respectivamente.

5.1.5.9 Concentração de PGE₂ do Líquido Sinovial

Os dados referentes à dosagem de PGE₂ (pg/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas encontram-se no apêndice I. Houve uma diferença significativa ($P < 0,001$) na média dos valores da PGE₂ (pg/mL) do líquido sinovial entre o grupo 1 ($49,86 \pm 16,24$) e o grupo 2 ($74,10 \pm 20,63$), não havendo diferença significativa de ambos com o grupo controle ($54,65 \pm 23,40$) (Figura 26). O grupo controle apresentou diferença significativa ($P < 0,01$) entre o 80º dia ($91,90 \pm 53,28$) e 280º dia ($25,54 \pm 9,73$); o grupo 1 entre o 40º dia ($77,01 \pm 22,14$) e 80º dia ($25,74 \pm 17,38$; $P < 0,001$), e no grupo 2 não foi encontrado diferença significativa ($P > 0,05$) entre os dias analisados.

Quando se comparou os grupos nos diferentes dias observou-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 1 somente no 80º dia ($91,90 \pm 53,28$ e $25,74 \pm 17,38$; $P < 0,001$); e com o grupo 2 nos dias 280 ($25,54 \pm 9,73$ e $113,34 \pm 61,10$; $P < 0,01$) e 360 ($43,46 \pm 18,19$ e $90,29 \pm 41,28$; $P < 0,01$). Os grupos 1 e 2 diferiram significativamente ($P < 0,05$) nos dias 120 ($37,10 \pm 20,58$ e $54,26 \pm 16,87$) e 240 ($39,61 \pm 32,91$ e $87,69 \pm 83,70$) (Figura 27).

Figura 26 – Valores médios finais da concentração de PGE₂ (pg/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

Figura 27 – Valores médios da PGE₂ (pg/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007

5.1.5.10 Concentração de TNF- α do Líquido Sinovial

Os dados referentes à dosagem da concentração de TNF- α (pg/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas encontram-se no apêndice I. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre a média final dos valores de TNF- α (pg/mL) do líquido sinovial do grupo controle ($560,53\pm202,92$), grupo 1 ($600,95\pm274,78$) e grupo 2 ($671,78\pm345,18$). Comparando-se as médias nos diferentes dias dentro de cada grupo houve uma diferença significativa ($P<0,05$) nos animais do grupo 1 entre o 40º dia ($1048,88\pm473,46$) e o 160º dia ($231,80\pm130,69$); e nos animais do grupo 2 entre o 320º dia ($1198,86\pm574,89$) com os dias 40 ($397,39\pm217,87$; $P<0,05$), 120 ($374,00\pm248,76$; $P<0,01$), 160 ($406,83\pm231,25$; $P<0,05$) e 240 ($442,45\pm333,86$; $P<0,05$).

Comparando-se os três grupos no mesmo dia observou-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 2 no 40º dia ($822,25\pm263,04$ e $397,39\pm217,87$; $P<0,01$); e entre o grupo 1 com o grupo 2 nos dias 40 ($1048,88\pm473,46$; $P<0,01$), 120 ($780,21\pm463,08$ e $374,00\pm248,76$; $P<0,05$) e 200 ($388,58\pm162,34$ e $1265,57\pm794,43$; $P<0,05$) (Figura 28).

Figura 28 – Valores médios do TNF- α (ng/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, nos dias zero, 40, 80, 240, 280 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360. São Paulo, 2007.

5.1.5.11 Análise da Imunocitoquímica das Células do Líquido Sinovial

Analisando-se a extensão da marcação do receptor anti-TNFRII, a maioria das amostras de líquido sinovial dos animais do grupo 1 (39,13%) apresentaram uma frequência de marcação das células variando de 10 a 33%, enquanto que a maioria dos animais do grupo controle e do grupo 2 apresentaram uma frequência de 1 a 10% (56,52% e 63,63% respectivamente). Quando se analisou a variação dentro de cada grupo no decorrer do tempo, 66,66% das amostras dos animais do grupo 1 apresentaram maior frequência da marcação (10 a 33%) nos dias 80 e 360, maior do que o dia zero, onde 60% das amostras obtiveram uma frequência de marcação de 1 a 10% (Apêndice J).

A intensidade da marcação do receptor anti-TNFRII das células do líquido sinovial apresentou-se maior, ou seja, com marcação moderada em 69,56% das amostras dos animais do grupo 1, quando comparadas com as do grupo controle, onde a intensidade de marcação foi discreta em 69,56% dos casos. Observando-se a variação dentro de cada grupo no decorrer do tempo, verificou-se que enquanto 80% das amostras do grupo 1 mostraram marcação discreta do receptor no dia zero, 33,33% mostraram marcação acentuada no 80º dia e 16,66% no 360º dia (Apêndice J).

Portanto 47,82% dos animais jovens em treinamento (grupo 1) obtiveram um escore total de marcação (ETM) maior (5) do que o grupo controle, onde 60,86% das amostras apresentaram um ETM de 3, e do que os animais adultos em treinamento, nos quais observou-se um ETM de 4 em 50% das amostras (Apêndice K).

As fotomicrografias ilustrando a marcação da imunocitoquímica das células do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas estão demonstradas nas figuras 29, 30 e 31.

Figura 29 – Fotomicrografia ilustrando o controle negativo da imunocitoquímica das células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal n°01 do grupo controle, no 80° dia. Marcação realizada apenas com DAB e não com o anticorpo primário. (aumento de 40X). São Paulo, 2007

Figura 30 – Fotomicrografia ilustrando a marcação da imunocitoquímica das células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal n°1, no dia zero. Célula com intensidade fraca de marcação (score 1) para o TNFRII (seta). (aumento de 40X). São Paulo, 2007

Figura 31 – Fotomicrografia ilustrando a marcação da imunocitoquímica das células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº27 do grupo 2, no 80º dia. Célula não marcada com TNFR II (seta menor) e célula com intensidade moderada de marcação para TNFR II (seta maior). (aumento de 40X). São Paulo, 2007

5.1.6 Exame Ultra-sonográfico das Articulações Metacarpofalangeanas

Os dados relativos à mensuração da cápsula articular dorsal, nos sentidos transversal e longitudinal, e do ligamento anular (cm) das articulações metacarpofalangeanas encontram-se nos apêndices K e L.

Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias finais da espessura da cápsula articular transversal entre o grupo 2 ($0,96 \pm 0,09$) com o grupo controle ($0,80 \pm 0,04$; $P < 0,001$) e grupo 1 ($0,85 \pm 0,14$; $P < 0,05$) (Figura 32). No sentido longitudinal houve diferença significativa somente entre o grupo 2 ($1,01 \pm 0,10$) e o grupo controle ($0,85 \pm 0,05$; $P < 0,05$) (Figura 33).

Figura 32 – Valores médios finais da espessura da cápsula articular dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através de exame ultra-sonográfico (secção transversal), dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

Figura 33 – Valores médios finais da espessura da cápsula articular dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através de exame ultra-sonográfico (secção longitudinal), dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

No dia zero, tanto no sentido transversal quanto longitudinal os animais do grupo 2 apresentaram uma cápsula articular mais espessa ($1,06 \pm 0,12$ e $1,12 \pm 0,13$ respectivamente) do que os animais do grupo controle ($0,75 \pm 0,14$; $p < 0,001$ e $0,91 \pm 0,16$; $P < 0,01$) e do grupo 1

($0,69 \pm 0,14$ e $0,89 \pm 0,14$; $P < 0,001$). Ainda em relação à espessura da cápsula articular dorsal no sentido transversal, os animais do grupo 1 apresentaram um aumento significativo ($P < 0,01$) em relação ao dia zero ($0,69 \pm 0,14$) e os dias 210 ($0,94 \pm 0,21$) e 360 ($0,93 \pm 0,17$). Os animais do grupo 2 apresentaram uma diminuição significativa nesta medida quando se comparou o dia zero ($1,06 \pm 0,12$) com o 210º dia ($0,94 \pm 0,15$; $P < 0,05$) e o 360º dia ($0,88 \pm 0,15$; $P < 0,01$) (Figura 34). Em relação à espessura da cápsula articular dorsal no sentido longitudinal houve somente diminuição significativa ($P < 0,05$) no grupo 2 nos dias 210 ($0,96 \pm 0,13$) e 360 ($0,95 \pm 0,18$) em relação ao dia zero ($1,12 \pm 0,13$) (Figura 35).

Figura 34 – Valores médios da espessura da cápsula articular dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos por exame ultra-sonográfico (secção transversal), dos animais do grupo controle, 1 e 2, nos dias zero, 210 e 360. São Paulo, 2007

Figura 35 – Valores médios da espessura da cápsula articular dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos por exame ultra-sonográfico (secção longitudinal), dos animais do grupo controle, 1 e 2, nos dias zero, 210 e 360. São Paulo, 2007

Em relação à espessura do ligamento anular houve diferença significativa entre o 360º dia ($0,09 \pm 0,02$) com o dia zero ($0,18 \pm 0,05$; $P < 0,001$) e o 210º dia ($0,14 \pm 0,03$; $P < 0,05$) no grupo controle, e entre o dia 210 ($0,22 \pm 0,06$) e os dias zero ($0,10 \pm 0,02$; $P < 0,001$) e 360 ($0,13 \pm 0,03$; $P < 0,01$) nos animais do grupo 1. Os animais do grupo 2 apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,01$) na espessura do ligamento anular no dia 360 ($0,12 \pm 0,03$) em relação ao dia zero ($0,21 \pm 0,09$) (Figura 36).

Comparando-se os três grupos no mesmo dia observou-se diferença significativa entre o grupo 1 e o grupo controle nos dias zero ($0,10 \pm 0,02$ e $0,18 \pm 0,05$; $P < 0,01$), 210 ($0,22 \pm 0,06$ e $0,14 \pm 0,03$; $P < 0,01$) e 360 ($0,13 \pm 0,03$ e $0,09 \pm 0,02$; $P < 0,05$); e entre o grupo 1 e o grupo 2 ($P < 0,001$) nos dias zero ($0,10 \pm 0,02$ e $0,21 \pm 0,09$) e 210 ($0,22 \pm 0,06$ e $0,14 \pm 0,02$) (Figura 36).

A espessura do ligamento anular não apresentou alterações significativas ($P > 0,05$) entre as médias finais dos grupos controle ($0,14 \pm 0,05$), grupo 1 ($0,15 \pm 0,06$) e grupo 2 ($0,16 \pm 0,05$).

Figura 36 – Valores médios da espessura do ligamento anular (cm) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos por exame ultra-sonográfico (secção transversal), dos animais do grupo controle, 1 e 2, nos dias zero, 210 e 360. São Paulo, 2007

Não foram encontradas alterações significativas ($P>0,05$) nos escores das imagens ultra-sonográficas das articulações metacarpofalangeanas entre os grupos controle, 1 e 2 para os seguintes critérios: perfil da silhueta óssea da articulação metacarpofalangeana, homogeneidade dos ramos lateral e medial do ligamento suspensor do bolete, e dos ligamentos colaterais, silhueta óssea no ponto de inserção dos ramos do ligamento suspensor do bolete e dos ligamentos colaterais e silhueta óssea dos sesamóides proximais, com 100% das articulações apresentando escore 1 para estes critérios analisados.

Em 52,77% das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo 1, e em 80,43% dos animais do grupo 2, visualizou-se na imagem ultra-sonográfica uma cápsula articular de aspecto heterogêneo, diferenciando-se dos animais do grupo controle, onde 77,14% das articulações apresentaram uma cápsula articular homogênea (Apêndice M).

O grau de homogeneidade da cápsula articular dos animais do grupo 1 se alterou no decorrer do tempo, ou seja, 66,66% das articulações metacarpofalangeanas demonstraram uma cápsula articular de aspecto heterogêneo e 16,66% apresentaram lesão na cápsula com

infiltração por líquidos, no 360º dia da avaliação ultra-sonográfica, diferentemente das imagens ultra-sonográficas no dia zero quando 75% das imagens apresentaram uma cápsula articular de aspecto homogêneo.

Em relação à quantidade de líquido sinovial visualizado na articulação metacarpofalangeana pelo exame ultra-sonográfico não se notou diferença significativa ($P>0,05$) nas imagens obtidas entre os animais dos grupos controle, 1 e 2. Houve aumento no volume do líquido em 64,28% das articulações dos animais do grupo 2, no 360º dia quando se comparou com o dia zero (Apêndice M).

As figuras 37, 38, 39, 40, 41 e 42 ilustram as imagens ultra-sonográficas realizadas nas articulações metacarpofalangeanas de todos os animais.

Figura 37 – Imagem ultra-sonográfica do plano transversal da cápsula articular dorsal da articulação metacarpofalangeana do animal nº 5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007

Figura 38 – Imagem ultra-sonográfica do plano longitudinal da cápsula articular dorsal da articulação metacarpofalangeana do animal nº5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007

Figura 39 - Imagens ultra-sonográficas dos planos longitudinais da inserção do ligamento suspensor do boleto lateral (A) e medial (B) da articulação metacarpofalangeana do animal nº 5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007

Figura 40 - Imagens ultra-sonográficas dos planos transversais dos ramos lateral (A) e medial (B) do ligamento suspensor do boleto da articulação metacarpofalangeana do animal nº5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007

Figura 41 – Imagens ultra-sonográficas dos planos longitudinais do ligamento colateral lateral (A) e medial (B) da articulação metacarpofalangeana do animal nº5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007

Figura 42 – Imagem ultra-sonográfica do plano transversal do ligamento anular e contorno dos ossos sesamóides proximais da articulação metacarpofalangeana do animal nº5 do grupo 1, no dia zero. São Paulo, 2007

5.1.7 Exame Radiográfico das Articulações Metacarpofalangeanas

Quanto às alterações radiográficas das articulações metacarpofalangeanas verificou-se que os animais do grupo 1 apresentaram aumento de volume dos tecidos moles peri-articulares, com perda de definição dos planos teciduais observados nas imagens radiográficas, em 21,73% dos casos e em 4,34% das imagens estas alterações estavam confinadas à cápsula articular. Nos animais do grupo 2, a perda de definição dos planos teciduais foi visualizada em 69,35% das articulações examinadas. Estes dados diferem significativamente ($P < 0,05$) dos animais do grupo controle, onde 100% das articulações não mostraram alterações radiográficas nos tecidos moles peri-articulares (Apêndice N).

Foi possível visualizar início de formação de osteófito na margem articular em 22,58% das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo 2, observando-se ainda a imagem bem definida de osteófitos em 9,67% das articulações, o que difere significativamente ($P < 0,01$) dos animais do grupo controle, com 100% das imagens sem alterações radiográficas nas articulações metacarpofalangeanas (Apêndice N).

Em 35,48% das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo 2 o osso subcondral apresentou-se mais denso na imagem radiográfica, com grau leve de esclerose subcondral, e em 19,35% das articulações foram encontradas zonas escleróticas localizadas na placa óssea subcondral. Estes dados diferem significativamente ($P < 0,001$) das articulações do grupo controle e grupo 1, onde 100% e 82,60%, respectivamente, não mostraram alterações no osso subcondral (Apêndice O).

Quanto ao aumento do espaço articular, às mudanças erosivas articulares e a presença de fragmentos osteocondrais e entesiófitos, não foram encontradas alterações significativas ($P > 0,05$) nas imagens radiográficas das articulações metacarpofalangeanas entre os grupos

controle, 1 e 2, com 100% das articulações apresentando escore zero para estes critérios analisados.

Os ângulos de flexão das articulações metacarpofalangeanas foram mensurados nas imagens radiográficas obtidas com a máxima flexão da articulação, na projeção latero-medial (figura 43).

Figura 43 – Imagens radiográficas das articulações metacarpofalangeanas na projeção latero-medial em flexão total do animal n°09 (A) do grupo 1 e do animal n°23 (B) do grupo 2, no dia 120. Imagem utilizada para mensuração do ângulo de flexão articular. Animal n°09 com maior flexão da articulação metacarpofalangeana. São Paulo, 2007

Os valores médios das mensurações de cada grupo encontram-se demonstrados no apêndice O. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) no valor do ângulo de flexão ($^{\circ}$) das articulações metacarpofalangeanas nos animais dentro do mesmo grupo nos diferentes dias. Comparando-se a média final de cada grupo houve diferença significativa entre o grupo controle ($128,50 \pm 1,30$) e o grupo 2 ($137,65 \pm 1,50$; $P<0,001$) e entre o grupo 1 ($131,62 \pm 0,99$) e o grupo 2 ($137,65 \pm 1,50$; $P<0,001$) (Figura 44). Quando se comparou os três grupos no

mesmo dia observou-se diferença significativa entre o grupo 2 e o grupo controle nos dias zero ($136,00 \pm 8,79$ e $127,83 \pm 3,56$; $P < 0,01$), 210 ($139,00 \pm 12,98$ e $127,66 \pm 4,81$; $P < 0,01$) e 360 ($138,85 \pm 7,04$ e $130,00 \pm 7,48$; $P < 0,01$); e com o grupo 1 somente no dia 360 ($138,85 \pm 7,04$ e $132,00 \pm 6,26$; $P < 0,05$) (Figura 45).

Figura 44 – Valores médios finais do ângulo de flexão (°) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos por exame radiográfico, dos animais do grupo controle, 1 e 2. São Paulo, 2007

Figura 45 – Valores médios do ângulo de flexão (°) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através de exame radiográfico, dos animais do grupo controle, nos dias zero, 210 e 360, e dos animais dos grupos 1 e 2, nos dias zero, 120, 210 e 360. São Paulo, 2007

As figuras 46 e 47 ilustram as imagens radiográficas, em quatro projeções pré-estabelecidas, obtidas de todos os animais.

Figura 46 – Imagens radiográficas da articulação metacarpofalangeana nas projeções latero-medial (A) e dorso-palmar (B) do animal n°27 do grupo 2, no dia zero. São Paulo, 2007

Figura 47 – Imagens radiográficas da articulação metacarpofalangeana nas projeções dorsomedial-palmarolateral 45° oblíqua (A) e dorsolateral-palmaromedial 45° oblíqua (B) do animal n°7 do grupo 1, no 360° dia. São Paulo, 2007

5.2 Experimento 2: Avaliação do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais em treinamento intenso imediatamente após exercício.

5.2.1 Avaliação Física

5.2.1.1 Avaliação Pós-jogo

Na avaliação após o término do jogo nenhum animal apresentou alterações no exame físico do sistema locomotor, particularmente das articulações metacarpofalangeanas.

5.2.2 Dosagem da Proteína Total Plasmática

Os dados referentes à concentração de proteína total plasmática (g/dL) dos animais atletas nos momentos zero, 3, 6 e 24 horas após o jogo de pólo encontram-se no apêndice P. Não houve alteração significativa ($P>0,05$) na concentração de proteína total plasmática dos animais atletas nos momentos analisados.

5.2.3 Dosagem da Glicose Plasmática

Os resultados referentes à concentração de glicose plasmática (mg/dL) dos animais atletas nos momentos zero, 3, 6 e 24 horas após o jogo de pólo encontram-se no apêndice P. Houve alteração significativa ($P>0,05$) na concentração de glicose plasmática dos animais

atletas às 3 ($89,75 \pm 13,15$) e 6 ($93,00 \pm 11,17$) horas após o término do jogo de pólo quando comparados aos momentos zero ($114,25 \pm 6,99$) e 24 horas ($101,25 \pm 4,19$) (Figura 48).

Figura 48 - Valores médios da concentração de glicose plasmática (mg/dL) dos cavalos atletas, antes (momento zero), 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. São Paulo, 2007.

5.2.4 Coleta de Líquido Sinovial

As coletas do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas no período anterior e posterior ao jogo não ocasionaram reações adversas e não interferiram com o desempenho dos animais durante o torneio de pólo. A colheita foi de fácil manipulação e sem contaminação sangüínea da amostra.

5.2.5 Análise do Líquido Sinovial

5.2.5.1 Coloração do Líquido Sinovial

Os resultados relativos à coloração da amostra de líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas encontram-se no apêndice Q. A coloração alterou significativamente ($P < 0,001$) no decorrer do tempo analisado. Antes do início do jogo de pólo 100% das amostras de líquido sinovial possuíam coloração amarelo palha, às 3 horas 62,5% das amostras alteraram a coloração tornando-se avermelhada, às 6 horas 50% delas continuaram com a coloração avermelhada, porém 50% já apresentaram coloração amarelo ouro. Às 24 horas após o término do jogo 100% das amostras permaneceram com a coloração amarelo ouro.

5.2.5.2 Aspecto do Líquido Sinovial

Os resultados referentes ao aspecto do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas encontram-se no apêndice Q. Não houve alteração significativa ($P > 0,05$) no aspecto do líquido sinovial nos momentos analisados, onde 100% dos animais apresentaram escore 1 para o parâmetro analisado.

5.2.5.3 Volume de Líquido Sinovial

Os resultados referentes ao volume de líquido sinovial (mL) obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas encontram-se no apêndice R. Observou-se diminuição significativa no volume de líquido sinovial obtido às 3 horas ($2,97 \pm 1,62$; $P < 0,05$) em relação ao momento zero ($5,41 \pm 1,92$) e às 3 e 6 horas ($3,08 \pm 1,80$) em relação às 24 horas ($6,25 \pm 1,75$; $P < 0,01$) (Figura 49).

Figura 49 - Valores médios do volume (mL) de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas dos cavalos atletas, antes (momento zero), 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. São Paulo, 2007

5.2.5.4 Contagem Global das Células do Líquido Sinovial

Os resultados referentes à contagem total de células nucleadas do líquido sinovial (cél/s/μL) das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas encontram-se no apêndice R. Não foram observadas alterações significativas ($P > 0,05$) no número total de células nucleadas entre os momentos analisados.

5.2.5.5 Proteína Total do Líquido Sinovial

Os resultados da concentração de proteína total (g/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas encontram-se no apêndice S. A proteína total do líquido sinovial aumentou significativamente ($P<0,05$) às 6 ($1,78\pm0,50$) e 24 h ($1,89\pm0,52$) em relação ao momento zero ($1,10\pm0,44$) (Figura 50).

Figura 50 - Valores médios da proteína total (g/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos cavalos atletas, antes (momento zero), 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. São Paulo, 2007

5.2.5.6 Glicose do Líquido Sinovial

Os resultados referentes a concentração de glicose (mg/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas encontram-se no apêndice S. A concentração de glicose do líquido sinovial diminuiu significativamente ($P<0,001$) às 3 ($84,00\pm13,63$), 6 ($89,16\pm8,47$) e 24 horas ($94,37\pm7,36$) em relação ao momento zero ($117,88\pm7,73$) (Figura 51).

Figura 51 - Valores médios da glicose (mg/dL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos cavalos atletas, antes (momento zero), 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. São Paulo, 2007

5.2.5.7 Concentração de PGE₂ do Líquido Sinovial

Os valores referentes à concentração de PGE₂ (pg/mL) do líquido sinovial obtido das articulações dos animais atletas encontram-se no apêndice T. Houve um aumento significativo dos valores da PGE₂ do líquido sinovial às 3 ($521,75 \pm 331,35$; $P < 0,01$) e 6 horas ($476,48 \pm 307,10$; $P < 0,05$) em relação ao momento zero ($116,59 \pm 51,61$). Houve também uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre os momentos 3 ($521,75 \pm 331,35$) e 24 horas ($182,72 \pm 91,88$) (Figura 52).

Figura 52 - Valores médios da concentração de PGE₂ (pg/mL) do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos cavalos atletas, antes (momento zero), 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo. São Paulo, 2007

5.2.5.8 Concentração de TNF- α do Líquido Sinovial

Os valores totais da concentração de TNF- α (pg/mL) do líquido sinovial obtido das articulações dos animais atletas encontram-se no apêndice T. Não foram observadas alterações significativas ($P>0,05$) na concentração de TNF- α entre os momentos analisados; zero ($992,33\pm604,16$), 3 ($535,00\pm489,79$), 6 ($838,75\pm500,13$) e 24 horas ($849,16\pm405,02$).

5.2.5.9 Análise da Imunocitoquímica das Células do Líquido Sinovial

Os resultados encontrados na análise semi-quantitativa da marcação do receptor do tipo II de TNF- α das células do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas encontram-se no apêndice U. Apesar da forte marcação observada nas células do líquido sinovial dos animais atletas 3 e 6 horas após o jogo de pólo, não houve alteração

significativa ($P>0,05$) nos escores para extensão e intensidade desta marcação entre os momentos analisados. Às 3 horas após o jogo 75% das amostras de líquido sinovial analisadas apresentaram aproximadamente 33 a 66% de células marcadas para o receptor anti-TNFRII, e às 6 horas 100% das amostras revelaram uma frequência de marcação variando de 10 a 33%.

A fotomicrografia ilustrando a marcação da imunocitoquímica das células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal atleta 3 horas após o jogo de pólo está demonstrada na figura 53.

Figura 53 – Fotomicrografia ilustrando a marcação da imunocitoquímica das células do líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana do animal nº1 às 3 horas após o término do jogo de pólo. Célula com intensidade forte de marcação (escore 3) para TNFRII (seta). (aumento de 40X). São Paulo, 2007

6. DISCUSSÃO

As articulações sinoviais dos eqüinos são submetidas a grandes variações de movimento, principalmente durante os exercícios realizados por atletas. Dentre estes atletas estão incluídos os animais que participam dos torneios de pólo e passam por um regime de treinamento intenso onde percorrem grandes distâncias em alta velocidade, seguidas de parada brusca do movimento. Estas manobras fazem com que a articulação metacarpofalangeana receba grande impacto, sendo submetida a graus variáveis de estresse mecânico.

Os tecidos articulares, sob a ação de impacto, reagem com uma resposta inflamatória de grau e intensidade dependentes da duração e magnitude da força externa. Já a manifestação clínica da inflamação articular pode ocorrer sob a forma de claudicação, com aumento de volume dos tecidos moles periarticulares, efusão sinovial, capsulite e sinovite.

Com o insulto repetitivo aos tecidos articulares devido ao constante exercício há uma inflamação crônica localizada, onde o processo de reparo e cicatrização tecidual é prejudicado. A reação inflamatória da porção fibrosa da cápsula articular leva ao seu espessamento, sendo que o processo de reparação tecidual ocorre em um período maior que vinte e oito dias (SALLES-GOMES, 2001). Este espessamento da cápsula articular pode ser evidenciado por um aumento na circunferência articular externa.

Neste estudo, os valores da circunferência articular externa diferiram estatisticamente entre os grupos onde, os animais adultos em treinamento (G2) apresentaram em média a circunferência da articulação metacarpofalangeana maior do que as dos animais jovens, quer sejam animais do grupo controle ou do grupo 1 ($P < 0,05$). Este maior valor da circunferência articular deveu-se ao aumento de volume de tecidos moles periarticulares evidenciados pelo

exame radiográfico, e pela maior espessura da cápsula articular analisada pelo exame ultrassonográfico, nos animais do grupo 2 ($P<0,05$).

Interessante observar que os animais do grupo 1 apresentaram espessamento gradativo ($P<0,05$) da cápsula articular da articulação metacarpofalangeana, no decorrer do período experimental, enquanto os animais do grupo 2 apresentaram diminuição.

Evidencia-se desta forma que o espessamento da cápsula articular devido aos microtraumas ocasionados pelo exercício intenso ocorre em longo prazo, possibilitando até mesmo uma adaptação destes animais às mudanças exigidas pelo esforço articular.

A maior circunferência articular nos animais do grupo 2, devido ao aumento de volume dos tecidos moles periarticulares, diminuiu a amplitude do movimento de flexão da articulação metacarpofalangeana. Isto pode ser observado através das análises dos ângulos de flexão das articulações nas imagens radiográficas, onde os animais jovens em início de treinamento (grupo controle e G1) apresentaram maior flexão da articulação metacarpofalangeana, representados no raio-x pelo menor ângulo de flexão palmar, em relação aos animais que participavam dos torneios há pelo menos 5 anos (G2).

Na tentativa de se quantificar o grau de inflamação dos tecidos articulares durante o período de treinamento realizou-se a análise física, química e citológica do líquido sinovial. Sabe-se que com a inflamação da membrana sinovial, devido ao microtrauma constante do exercício, há maior influxo de células inflamatórias ao local, com vasodilatação dos capilares sinoviais, liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e prostaglandinas, e aumento na produção do líquido sinovial, caracterizando então a efusão articular (LOHMANDER; FELSON, 1997; GHOSH; SMITH, 2002; IRIE; UCHIYAMA; IWASO, 2003; BENITO et al., 2005; McILWRAITH, 2005).

Durante a realização de movimentos articulares de grande amplitude, em articulações com membrana sinovial do tipo areolar, há maior fricção entre os tecidos articulares,

causando liberação de debris na cavidade articular, hiperemia tecidual e maior difusão de soro para a cavidade articular (PERSSON, 1971; LEVICK, 1987). Tanto os animais jovens como os adultos em treinamento (G1 e G2) apresentaram um aumento na quantidade de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas no decorrer do tempo experimental, sendo estatisticamente significante as diferenças entre os valores do grupo 2 quando comparado aos valores do grupo controle e do grupo 1.

Persson (1971) observou que o movimento articular leva a um aumento do volume de líquido sinovial, provavelmente devido à maior difusão do soro para a cavidade articular. Os resultados obtidos por este autor foram um aumento significativo no volume do líquido sinovial após o exercício, que persistiu por uma hora após o término deste e retornou aos valores normais duas horas após. Nos animais do nosso trabalho houve diminuição na quantidade de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas às 3 e 6 horas após o término do jogo de pólo (experimento 2), com aumento desta quantidade 24 horas após (experimentos 1 e 2).

No trabalho de Persson (1971) os cavalos foram exercitados ao trote, em esteira, durante 30 minutos. Em nosso trabalho os jogos de pólo eram realizados em um período de 7 minutos cada tempo de jogo, num total de 6 tempos. Os animais em treinamento (G1 e G2) participavam destes jogos, durante em média 8 minutos cada animal, sendo exercitados a galope. Os animais adultos, com maior tempo de carreira esportiva, às vezes participavam destes jogos durante 15 minutos, com intervalos entre os tempos de 7 minutos. Portanto a diferença na intensidade (trote x galope) e tempo do exercício nos dois trabalhos pode ser responsável pelos resultados obtidos na quantidade de líquido sinovial.

No presente trabalho os animais em treinamento (G1 e G2), com flexão articular ativa durante o jogo de pólo, apresentaram maior difusão de soro para a cavidade articular, às 24 horas após o término do exercício, sendo que se obteve maior quantidade de líquido sinovial

dos animais adultos (G2) quando comparados aos animais jovens (grupo controle e G1). Esta diferença pode ter ocorrido pelo maior tempo de exercício que os animais do grupo 2 realizaram, com maior estresse imposto aos tecidos articulares.

Persson (1971) ainda relata que a anatomia da membrana sinovial pode contribuir para o aumento da difusão do soro à cavidade articular, assim como o tipo de movimento realizado pela articulação. Segundo Persson (1971) a articulação metacarpofalangeana é adaptada para a realização de movimentos mais pronunciados e possui uma membrana sinovial com tecido conjuntivo do tipo areolar e mais vascularizado, apresentando com isso maior difusão do soro à cavidade articular quando comparada com outra articulação, como a interfalangeana distal.

Segundo Rhineland, Bennett e Bauer (1939) há aumento na absorção de líquidos, via linfática sub-sinovial, nas articulações que realizam movimentos passivos de flexão e extensão, que pode ser explicado pelas alterações de pressão intra-articular. Hardy, Bertone e Muir (1998) relataram aumento de pressão intra-articular associado ao aumento na produção de líquido sinovial em articulações com processo inflamatório ativo.

O maior movimento articular, com maior produção do líquido sinovial, provoca hiperemia sinovial com extravazamento de eritrócitos para a cavidade articular (LEVICK, 1987), e aumento na permeabilidade da barreira sangüínea-articular. Nos animais adultos em treinamento (G2) a coloração do líquido sinovial foi estatisticamente diferente dos animais jovens (grupo controle e G1), sugerindo uma hiperemia dos vasos sinoviais devido ao exercício intenso. Além disso, MacWilliams e Friedrichs (2003) relatam que a suspensão de partículas no líquido sinovial pode originar um líquido de aspecto turvo, o que não foi observado nos animais deste trabalho.

Em relação à viscosidade do líquido sinovial tanto os animais adultos quanto os jovens não apresentaram alterações na qualidade do teste do precipitado de mucina. Este teste avalia o grau de polimerização do ácido hialurônico (AH), sendo, portanto qualitativo. Nas doenças

articulares pode ocorrer diminuição na viscosidade do líquido sinovial devido à diminuição na quantidade de AH (TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1994; TULAMO et al., 1996; CARON, 2003; POPOT et al., 2004), e nas articulações em treinamento pode ocorrer diluição do AH devido ao aumento na produção de líquido sinovial (PERSSON, 1971), alterando então o teste do precipitado de mucina. No presente trabalho observou-se somente alteração significativa ($P < 0,05$) no teste do precipitado de mucina nos animais do G2 no 280º dia, com formação de um grumo de mucina de qualidade ruim. Esta alteração pode ser explicada pela maior quantidade de eritrócitos no líquido sinovial, já que neste dia este apresentava coloração avermelhada.

Segundo MacWilliams e Friedrichs (2003) e Sugiuchi et al. (2005) a contagem total de células nucleadas permite estabelecer diferenças entre condições inflamatórias e não inflamatórias, onde o tipo e o número de leucócitos que infiltram a membrana sinovial e migram para o líquido articular definirão o componente celular da efusão articular (MacWILLIAMS; FRIEDRICHS, 2003). Não foram observadas alterações significativas na contagem total de células nucleadas do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas entre os três grupos analisados, mostrando que este tipo de avaliação não foi capaz de quantificar precocemente o processo inflamatório inicial desencadeado pelo exercício. Persson (1971) também não observou aumento no número de células inflamatórias no líquido sinovial das articulações cárpicas, társicas e metacarpofalangeanas dos cavalos após o exercício. Deve-se levar em consideração que a variação no número de leucócitos do líquido sinovial normal é muito ampla, 32-170 células/mm³ em articulações normais em repouso e 250-690 células/mm³ em articulações em movimento (PERSSON, 1971), podendo também explicar o fato de não ter sido encontrada diferença significativa entre os grupos de animais analisados.

As células freqüentemente observadas no líquido sinovial normal são mononucleares (linfócitos, monócitos), com pequena porcentagem de células polimorfonucleares (neutrófilos) (VAN PELT, 1974).

Em relação à contagem diferencial das células do líquido sinovial observou-se que os animais do grupo 1 e grupo 2 apresentaram maior porcentagem de monócitos, macrófagos e sinoviócitos que os animais do grupo controle, com maior quantidade de linfócitos, demonstrando que o movimento articular intenso promoveu maior ativação dos tipos celulares com função fagocítica. Warren, Bennett e Bauer (1935) também observaram maior porcentagem destas células nas articulações com grande movimentação nos bovinos. Curtiss (1964) relatou ainda que a maioria das células do líquido sinovial é fagocítica, sendo destinadas à remoção dos debrís produzidos pelo movimento articular normal. Isso pode explicar porque os animais em treinamento (G1 e G2), realizando exercícios mais intensos, apresentaram maior porcentagem destas células no líquido sinovial.

Além disso, sabe-se que as células da membrana sinovial, os sinoviócitos, são denominadas macrofágicas (tipo A) e fibroblásticas (tipo B), sendo que as células do tipo A são encontradas em maior quantidade para atuarem na remoção dos debrís que aparecem no espaço articular devido à ação dos movimentos abrasivos da membrana sinovial (CURTISS, 1964; IWANAGA et al., 2000). Podemos então considerar que as células do tipo A são os macrófagos residentes da membrana sinovial que quando ativadas são liberadas no espaço articular para a realização da fagocitose de debrís oriundos da membrana sinovial e da cartilagem articular. Segundo Shikichi et al. (1999) a superfície estrutural dos sinoviócitos do tipo A é idêntica aos macrófagos e são imunoreativas a muitos anticorpos monoclonais anti-macrófagos.

Logo, apesar de ter ocorrido pouca diferença na porcentagem de células nucleadas entre os diferentes grupos, a observação de sua morfologia mostrou maior ativação celular,

com realização de fagocitose pelos macrófagos (Figura 19) e sinoviócitos no líquido sinovial nas articulações dos animais jovens e adultos em treinamento intenso (G1 e G2).

O conteúdo de proteína total do líquido sinovial corresponde a 30% da proteína total plasmática (CURTISS, 1964; VAN PELT, 1974; LEVICK, 1987), mas durante inflamações articulares, com a hiperemia da membrana sinovial, há maior permeabilidade às macromoléculas, ocorrendo extravazamento de proteínas para o espaço articular e conseqüentemente um aumento de sua concentração. Durante o movimento articular intenso também ocorre vasodilatação dos capilares sinoviais, com aumento na quantidade de proteína no líquido sinovial (PERSSON, 1971; NILSSON; PERSSON 1973). Tanto os animais do grupo 1 como os do grupo 2, ou seja, cavalos em treinamento intenso, mostraram quantidades maiores de proteína no líquido sinovial do que os animais do grupo controle, sugerindo que realmente a realização de movimentos articulares mais ativos e intensos levam a esta alteração, corroborando então com os achados de Persson (1971) e Nilsson e Persson (1973). Este fator deve ser levado em consideração quando são analisados os líquidos sinoviais de cavalos atletas com suspeitas de doença articular.

A concentração de glicose no líquido sinovial diminui durante as inflamações, devido ao seu consumo pelas células inflamatórias (VAN PELT, 1974). Apesar de ter sido observado diferença significativa na concentração de glicose do líquido sinovial entre os três grupos, sendo maior no grupo 1, ou seja, nos animais jovens com atividade física intensa, os valores de glicose do líquido sinovial de todos os animais acompanharam as respectivas concentrações plasmáticas. Mahaffey (1992) relata que a concentração de glicose no sangue e no líquido sinovial devem ser equivalentes.

Segundo Wasserman, kallfelz e Lust (1993) o transporte de glicose do plasma para o líquido sinovial ocorre por difusão facilitada, a qual pode estar aumentada nas articulações com o aumento da permeabilidade dos capilares da membrana sinovial devido ao movimento

articular vigoroso realizado pelos animais dos grupos em treinamento. Além disso, o consumo de glicose pelas células inflamatórias pode ter sido baixo devido à pequena quantidade destas células no líquido sinovial destes animais.

Os movimentos abrasivos sobre a membrana sinovial durante o exercício, provocam uma resposta inflamatória, levando a liberação de mediadores inflamatórios e citocinas (MYERS et al., 1990; BENITO et al., 2005). A concentração de TNF- α detectada no líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas foi maior nos animais do grupo 1 e grupo 2, quando comparado aos animais do grupo controle. Apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa, a maior quantidade de TNF- α na articulação dos animais em treinamento indica maior ativação da resposta inflamatória da membrana sinovial. Associado a este fato foi observado maior ativação das células inflamatórias na análise citológica do líquido sinovial dos animais em treinamento, principalmente dos macrófagos, que juntamente com os sinoviócitos são as principais células responsáveis pela liberação do TNF- α no ambiente articular (BOURY et al., 1998; GHOSH; SMITH, 2002; CARON, 2003).

Billinghurst, Fretz e Gordon (1995) analisaram a concentração de TNF- α no líquido sinovial de equinos atletas com doença articular degenerativa, detectando um aumento significativo de TNF- α às 12 horas pós-corrida, com os valores diminuindo, mas permanecendo acima do normal 26 horas após. Este aumento significativo não ocorreu em nosso experimento, e ao nosso ver o principal fator que diferenciou os trabalhos foi a presença de lesões degenerativas nas articulações dos animais utilizados por Billinghurst, Fretz e Gordon (1995). O fato das coletas ter ocorrido em momentos diferentes não nos parece ter maior influência, uma vez que no experimento 2 de nosso trabalho as amostras coletadas com zero, 3, 6, e 24 horas após exercício não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

Van den Boom et al. (2004) avaliaram a influência da artrocentese seriada e do exercício na quantidade de TNF- α no líquido sinovial em articulações de equinos normais, concluindo que a intensidade do exercício utilizado não levou a um aumento nos níveis de TNF- α . Em nosso trabalho houve um aumento não significativo na concentração de TNF- α nos animais com maior tempo de carreira esportiva. Em estudos experimentais que realizaram a administração intra-articular de endotoxinas para avaliar a atividade do TNF- α , o seu pico de aumento ocorreu às 2 horas após o insulto (HAWKINS et al., 1995). Portanto, a resposta inflamatória dos tecidos articulares depende do tipo, da intensidade e da duração do insulto. A concentração de TNF- α no líquido sinovial dos animais jovens e adultos em treinamento (G1 e G2), do presente trabalho, sofreu pouca variação no decorrer do tempo analisado, onde todas as coletas foram realizadas 24 horas após o término da corrida. Estes resultados podem indicar uma adaptação dos tecidos articulares à atividade física constante e de alta intensidade a que estes animais são submetidos.

A IL-1 também atua como uma citocina pró-inflamatória com efeitos deletérios sobre a cartilagem articular, sendo liberada precocemente pelas células inflamatórias e pelos sinoviócitos no líquido sinovial (CARON, 1992; MAY 1997; BERTONE; PALMER; JONES, 2001; VAN DEN BERG, 2001).

A homologia entre a IL-1 recombinante de humano com a IL-1 de equino, é da ordem de 70%, tendo, portanto baixa especificidade. Os resultados obtidos para a concentração de IL-1 do líquido sinovial dos animais deste trabalho não foram condizentes com os achados da literatura consultada. Principalmente, porque estudos anteriores utilizaram animais com lesões degenerativas articulares. Logo, o fato dos valores de IL-1 terem permanecido abaixo dos valores detectáveis pelo teste pode ser decorrente do fato da baixa especificidade ou realmente devido aos baixos níveis desta citocina em articulações normais. Outros trabalhos estão sendo conduzidos com amostras normais de líquido sinovial de animais atletas, utilizando-se a

técnica de RT-PCR para a quantificação indireta dos níveis de IL-1 através da expressão gênica das células do líquido sinovial.

Segundo Hardy et al. (1998) a PGE_2 é o mediador inflamatório mais importante encontrado na inflamação articular. Nas primeiras 12 horas, o fluido inflamatório contém PGE_2 , 6-keto- $PGF_{1\alpha}$, tromboxano B_2 e leucotrieno B_4 , mas após 24 horas do insulto, somente a PGE_2 permanece em quantidades significativas (GIBSON; HODGE; WHITTEM, 1996). Foi observada diferença significativa entre os valores de PGE_2 do líquido sinovial dos animais do grupo 2 em relação aos animais do grupo 1. A maior concentração de PGE_2 nestes animais juntamente com uma quantidade aumentada de $TNF-\alpha$ pode sugerir uma resposta inflamatória mais acentuada nestas articulações. Além disso, segundo Martel-Pelletier, Pelletier e Fahmi (2003) a síntese de PGE_2 pode aumentar sob a ação do $TNF-\alpha$, o que pode ter ocorrido no grupo 2. Além disso sabemos que ocorreu maior ativação das células inflamatórias responsáveis pela produção e liberação da PGE_2 .

O método de imunocitoquímica (ICQ) permitiu a avaliação da expressão do receptor de TNF do tipo II em células do líquido sinovial, fixadas previamente em lâmina. Interessante observar que as amostras de maiores escores de marcação (ETM 5 a 7) tanto dos animais do grupo 1 como dos animais do experimento 2, coletadas às 3 horas após o término do jogo de pólo, são amostras referentes aos animais mais jovens e que estavam jogando na época da coleta das amostras.

Mesmo que não haja nenhum trabalho publicado que indique o escore padrão de células do líquido sinovial para este marcador, os resultados sugerem que houve uma correlação dos dados, ou seja, quanto maior a atividade e mais jovens os animais, maior foi a expressão deste receptor. Esta maior expressão do receptor de TNF , juntamente com o resultado da concentração de $TNF-\alpha$ livre no líquido sinovial dos animais jovens em treinamento, sendo menor dos que nos animais adultos, pode indicar um maior número de

ligações da molécula com seu receptor de membrana localizado nas células inflamatórias e sinoviais.

Apesar disto, esta técnica tem suas limitações e estas devem ser levadas em consideração. A primeira delas é a utilização de um anticorpo anti-humano do receptor tipo II do TNF que poderia conferir um baixo sinal de marcação devido à pouca especificidade, contudo testes prévios de titulação do anticorpo revelaram que a concentração de 1:50 foi a diluição apropriada que conferiu positividade nos testes.

Neste caso, descartamos que a falta de especificidade para tal marcador em algumas lâminas tenha sido decorrente do uso de um anticorpo anti-humano. Outro fator a ser levado em conta, no caso das amostras com escore total de 2, e que pode ter interferido na marcação, seriam as condições adversas de fixação das células. Apesar de todas as lâminas terem sido fixadas em acetona, o tempo de fixação até a realização da técnica das lâminas analisadas foi variado.

Assim, acreditamos que mesmo que não tenha sido encontrada uma diferença marcante na expressão deste receptor após a análise de escores, não descartamos a possibilidade desta diferença existir e, que poderia ser melhor avaliada utilizando-se outras técnicas, como por exemplo, a citometria de fluxo. Esta técnica apresenta vantagem em relação à imunocitoquímica (ICQ) ou imunoistoquímica porque enquanto na ICQ a positividade é baseada em um número baixo de eventos (normalmente são avaliadas 200 células), na citometria de fluxo são considerados de 5000 a 10.000 eventos, valor este mais representativo da amostra estudada.

Logo, faz-se necessário outros estudos acerca da expressão do receptor do tipo II do TNF nas células do líquido sinovial de cavalos atletas, principalmente no que diz respeito ao número de amostras analisadas para que possamos afirmar com mais consistência seu papel nos processos inflamatórios articulares.

Nas avaliações das imagens radiográficas foram observadas alterações significativas, ou seja, aumento de volume nos tecidos moles periarticulares, frequência de formação de osteófitos na margem articular e no grau de esclerose do osso subcondral nos animais do grupo 2, comparativamente aos animais do grupo controle e grupo 1.

Estas alterações mais evidentes nos animais adultos em treinamento evidenciam o efeito do exercício sobre as articulações no decorrer da carreira esportiva dos equinos. A ação das forças de impacto geradas pelo exercício sobre uma articulação com grau leve de inflamação articular, como demonstrado nos achados anteriores, altera a capacidade biomecânica da cartilagem articular, levando a formação de osteófitos, e desenvolvimento de áreas de esclerose subcondral. Os achados do presente trabalho corroboram com as observações feitas por Hopper et al. (2004) que estudaram o desenvolvimento da esclerose subcondral em animais atletas, durante um ano, observando um aumento significativo no grau e na ocorrência de esclerose. Além disso, as alterações radiográficas aparecem mais tardiamente nas doenças articulares, podendo explicar a maior ocorrência destas lesões nos animais adultos em treinamento.

As alterações radiográficas observadas nos tecidos moles periarticulares nos animais do grupo 2 já no início do experimento englobam o aumento na espessura da cápsula articular fibrosa observado no exame ultra-sonográfico. Além disso, estes animais apresentaram maior circunferência articular e menor flexão da articulação metacarpofalangeana quando comparados aos animais controle e do grupo 1. Isto pode ser explicado pelo maior tempo de carreira esportiva destes animais, onde os tecidos articulares são submetidos ao estresse constante e intenso do treinamento, com inflamação crônica da membrana sinovial e cápsula articular. Estas alterações podem ser consideradas adaptativas, pois nenhum animal apresentou sinais clínicos evidentes de doença articular.

Apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos na maioria dos escores para os critérios analisados pelo exame ultra-sonográfico, o grau de homogeneidade da cápsula articular da articulação metacarpofalangeana dos animais do grupo 2 foi menor do que os animais do grupo controle e grupo 1, ou seja, apresentavam um aspecto mais heterogêneo na imagem ultra-sonográfica. Já os animais do grupo 1 apresentaram, no decorrer do tempo, uma diferença no grau de homogeneidade da cápsula articular com aumento na sua espessura, mas sem outras alterações significativas. Isto pode ser explicado pelo aumento na exigência dos movimentos articulares nos animais em início de carreira esportiva, com adaptação dos tecidos articulares e aumento da resposta inflamatória.

Houve maior quantidade de líquido sinovial na articulação metacarpofalangeana visualizada ao exame ultra-sonográfico nos animais do grupo 2. Este resultado associa-se à quantidade de líquido sinovial obtido destas articulações no momento das coletas realizadas, com um maior volume sendo resgatado nos animais adultos.

Como todas as coletas de líquido sinovial foram realizadas 24 horas após o término do jogo, no dia seguinte à competição, todos os resultados mostraram o comportamento dos tecidos articulares com um dia de descanso, onde os níveis dos marcadores inflamatórios poderiam estar voltando aos valores basais de cada animal. Frente a isto, foram coletadas amostras de líquido sinovial de um grupo de animais em treinamento antes do jogo de pólo e às 3, 6 e 24 horas após o término deste, para se avaliar o comportamento destes parâmetros logo após o insulto mecânico provocado pelo exercício intenso.

Como já mencionado, os animais do experimento 2 mostraram diminuição no volume de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas, 3 e 6 horas após o término do exercício. Sabe-se que o movimento articular induzido durante o exercício é o maior agente ativador da circulação sinovial, modificando a pressão intra-articular e o fluxo sanguíneo sinovial (BERTONE, 2004). Acredita-se que esta diminuição pode ser

consequência do aumento do *turnover* sinovial, uma vez que o acúmulo de líquido em grandes quantidades na cavidade articular aumentaria a pressão intra-articular acima dos valores fisiológicos, com formação de efusão articular, acarretando em lesões isquêmicas na membrana sinovial e ainda, em dor articular. Também, o movimento de líquido através da membrana sinovial para o interstício e vasos linfáticos aumenta durante o exercício, melhorando a rotatividade do líquido articular (RHINELANDER; BENNETT; BAUER, 1939).

Possivelmente devido à maior perfusão dos tecidos articulares, com maior difusão do soro para o interior da cavidade articular e formação de líquido sinovial, 24 horas após o término do exercício, houve um retorno aos valores basais do volume de líquido sinovial obtido das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas. Persson (1971) relatou aumento no volume de líquido sinovial devido ao exercício, o qual persistiu somente até duas horas após o término da atividade física. Esta diferença nos resultados obtidos pode ser explicada pela diferença na intensidade do exercício realizado nos dois trabalhos, pois Persson (1971) utilizou animais exercitados ao trote em esteira.

A hiperemia da membrana sinovial pode ser a responsável pela alteração na coloração do líquido articular obtido das articulações destes animais atletas, 3 e 6 horas após o término do exercício, caracterizando a presença de hemartrose, com retorno à normalidade 24 horas após o término do jogo.

O conteúdo de proteína no líquido sinovial são representados principalmente pela albumina. A albumina articular e o hialuronato, os colóides sinoviais, são moléculas que possuem um papel importante na pressão oncótica e governam a dinâmica do líquido articular (BERTONE, 2004). Esta dinâmica é orientada pela permeabilidade capilar, pressão intra-articular e concentração de proteína, mais do que pela concentração do hialuronato. Com a inflamação da membrana sinovial altera-se a permeabilidade capilar, e ocorre aumento na

concentração de proteína total presente no líquido sinovial. Neste trabalho os animais atletas apresentaram aumento na quantidade de proteína no líquido sinovial após o exercício. A maior quantidade de proteína articular sugere o aumento da permeabilidade capilar e a maior dinâmica do líquido articular como resultado do insulto repetitivo do exercício à membrana sinovial e pode representar um dos sinais da reação inflamatória.

Com o aumento na permeabilidade capilar e no *turnover* do líquido sinovial ocorre um maior influxo das células inflamatórias para a cavidade articular. A contagem destas células no líquido sinovial não aumentou substancialmente nos períodos analisados após o exercício. Este controle na população celular torna-se importante no ambiente articular uma vez que estas células são fontes de mediadores inflamatórios, como as citocinas, as prostaglandinas, e as enzimas destrutivas da matriz cartilaginosa.

Houve uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na concentração de glicose do líquido sinovial em todos os momentos após o término do exercício, o qual acompanhou a diminuição na concentração plasmática da glicose destes animais. Esta diminuição pode ocorrer devido ao exercício intenso, concomitante a não ingestão de alimentos neste período imediato após o término do jogo de pólo, já que 24 horas após, a concentração de glicose voltou aos valores basais.

A menor concentração de TNF- α no líquido sinovial dos animais atletas 3 horas após o exercício pode ter ocorrido pela ligação desta molécula aos seus receptores de membrana localizados nas células inflamatórias e sinoviais. A ligação com o receptor de membrana do tipo I (TNFRI) com domínio citoplasmático para a morte celular (TRADD) ativa a apoptose celular, mas a ligação com o receptor de membrana do tipo II (TNFRII) ativa os fatores de transcrição nas células alvo (NF- κ B e AP-1) com produção dos mediadores inflamatórios, dentre eles as prostaglandinas. Às 3 horas após o término do exercício observou-se um aumento na concentração de PGE₂ no líquido sinovial destes animais e este estímulo pode ter

sido causado pela ligação do TNF- α com o TNFRII, o qual foi marcado positivamente nas células do líquido sinovial destes animais pelo teste da imunocitoquímica.

Os valores encontrados de PGE₂ no líquido sinovial das articulações dos animais atletas apresentaram um significativo aumento às 3 horas após o término do exercício, permanecendo aumentado até às 6 horas. Kirker-Head et al. (2000) analisaram as concentrações de PGE₂ nas articulações de cavalos sadios e de animais com osteoartrite (OA), encontraram valores de 5,7 pg/mL e 361,60 pg/mL, respectivamente. A concentração de PGE₂ nos animais atletas, do presente trabalho se aproximou dos valores encontrados em animais com OA, sendo de 116,10 pg/mL no momento zero, e de 521,75 pg/mL às 3 e 476,49 pg/mL às 6 horas após o exercício.

7 CONCLUSÃO

A prática esportiva do jogo de pólo provoca uma resposta inflamatória nos tecidos articulares dos eqüinos, principalmente nos animais com maior tempo de carreira atlética.

A contagem total das células nucleadas do líquido sinovial não é capaz de identificar a resposta inflamatória induzida pelo exercício, diferentemente da quantificação da PGE₂ e da análise da imunocitoquímica.

Apesar da resposta inflamatória dos tecidos articulares induzida por exercício não provocar sinais clínicos de doença articular, caracterizada por dor e claudicação, leva ao aparecimento de alterações radiográficas e ultra-sonográficas em animais com longa carreira esportiva.

A resposta inflamatória dos tecidos articulares frente ao insulto mecânico do exercício, com maior intensidade às 3 horas após término da atividade esportiva e retornando à normalidade 24 horas após, revela a grande capacidade da adaptação articular frente ao estresse físico. Contudo, isto não impede que cavalos com carreira atlética longa desenvolvam osteoartrite.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, S. J. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed.: Philadelphia: Saunders Company, 2000. 553 p.

ALAAEDDINE, N.; DIBATTISTA, J. A.; PELLETIER, J. P.; CLOUTIER, J. M.; KIANSA, K.; DUPUIS, M.; MARTEL-PELLETIER, J. Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. **Journal of Rheumatology**, v. 24, p. 1985-1994, 1997.

AMIN, A. R. Regulation of tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 7, p. 392-394, 1999.

ARMSTRONG, S.; LEES, S. Effects of carprofen (R and S enantiomers and racemate) on the production of IL-1, IL-6 and TNF- α by equine chondrocyte and synoviocyte. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic**, v. 25, p. 145-153, 2002.

BENITO, M. J.; VEALE, D. J.; FITZGERALD, O.; VAN DEN BERG, W. B.; BRESNIHAN, B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, n. 9, p. 1263-1267, 2005.

BERGQVIST, A.; FERNÖ, M.; SKOOG, L. Quantitative enzyme immunoassay and semiquantitative immunohistochemistry of oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium. **Journal of Clinical Pathology**, v. 50, p. 496-500, 1997.

BERTONE, 2004. Joint physiology: responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, K.W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine sports medicine and surgery. Basic and clinical sciences of the equine athlete**. Saunders: China. 2004. p. 152-160.

BERTONE, A. L.; PALMER, J. L.; JONES, J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. **Veterinary Surgery**, v. 30, p. 528-538, 2001.

BILLINGHURST, R.C. Biomarkers of joint disease. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. 5ed. Philadelphia: Saunders Company, 2002. p.513-20.

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

BOURY, N. M.; BOSWORTH, B. T.; STABEL, T. J.; KEHRLI, M. E.; TAYLOR, J. J. Cloning and expression of porcine recombinant soluble tumor necrosis factor receptor 1. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 10, p. 1317-1322, 1998.

CALLUM, W. H.; QILI CHU, BUDSBERG, S. C.; CLAYTON, M. K.; JOHNSON, K. A. Synovial fluid interleukin 6, tumor necrosis factor, and nitric oxide values in dogs with osteoarthritis secondary to cranial cruciate ligament rupture. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 9, p. 1027-1032, 1997.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. St. Louis: Saunders Company, 2003. p. 572-591.

CARON, J. P. Understanding the pathogenesis of equine osteoarthritis. **British Veterinary Journal**, v. 148, p. 369-371, 1992.

CURTISS, P. H. Changes produced in the synovial membrane and synovial fluid by disease. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 46-A, n. 4, p. 873-888, 1964.

DAVIES, D. V. The cell content of synovial fluid. **Journal of Anatomy**, v. 9, p. 66-73, 1945.

DENOIX, J. M. Joints and miscellaneous tendons (miscellaneous tendons and ligaments). In: RANTANEN, N. N.; McKINNAN, A. O. **Equine diagnostic ultrasonography**. Pennsylvania: Williams & Wilkins Media, 1998. p. 475-514.

DENOIX, J. M. Ultrasonographic examination in the diagnosis of joint disease. In: McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders Company, 1996. p. 40-70.

DENOIX, J. M.; STEPHANIE, J.; BOUSSEAU, B.; PERROT, P. Ultrasonographic anatomy of the dorsal and abaxial aspects of the equine fetlock. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, n. 1, p. 54-62, 1996.

DIK, K. J. Ultrasonography in the diagnosis of equine lameness. **Veterinary Annual**, v. 30, p. 162-171, 1990.

DYSON, S. J. Radiography and radiology. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. St. Louis: Saunders Company, 2003. p. 153-166.

EDWARDS, J. C. W. The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation. **Journal of Anatomy**, v. 184, p. 493-501, 1994.

FERNANDEZ, F.; GRINDEM, C. B.; LIPOWITZ, A. J.; PERMAN, V. Synovial fluid analysis: preparation of smears for cytologic examination of canine synovial fluid. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 19, p. 727-734, 1983.

FRISBIE, D. D.; AL-SOBAYIL, F. A.; BILLINGHURST, C.; McILWRAITH, C. W. Synovial fluid biomarkers distinguish exercise from osteoarthritic pathology. In: **ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS**, 49., 2003, New Orleans, Louisiana.

FLICK, D. A.; GIFFORD, G. E. Compararison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. **Journal of Immunological Methods**, v. 68, n. 1-2, p. 167-175, 1984.

GHOSH, P. The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for the use of pentosan polysulfate for its treatment. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 28, p. 211-267, 1999.

GHOSH, P.; SMITH, M. Osteoarthritis, genetic and molecular mechanisms. **Biogerontology**, v. 3, p. 85-88, 2002.

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, M. B. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. **Connective Tissue Research**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 1999.

GRAABAEK, P. M. Ultrastructural evidence for two distinct types of synoviocytes in rat synovial membrane. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 78, p. 321-339, 1982.

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

HARDY, J.; BERTONE, A. L.; WEISBRODE, S. E.; MUIR, W. W.; O'DORISIO, T. M.; MASTY, J. Cell trafficking, mediator release, and articular metabolism in acute inflammation of innervated or denervated isolated equine joint. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 88-100, 1998.

HARDY, R.; WALLACE, L. Arthrocentesis and synovial membrane biopsy. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 4, p. 449-462, 1974.

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 antebrachiocondylar joints injected with endotoxin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 10, p. 1292-1299, 1995.

HAWKINS, D. L.; MACKAY, R. J.; GUM, G. G.; COLAHAN, P. T.; MEYER, J. C. 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, p. 379-386, 1993.

HAWKINS, D. L.; RICHARDSON, D. W. Synovial fluid analysis. In: COLAHAN, P.T.; MAYHEW, I.G.; MERRITT, A.M.; MOORE, J.N. **Equine medicine and surgery**. St. Louis: Mosby, 1999. p. 1306-1308.

HOLLANDER, J. L.; REGINATO, A.; TORRALBA, T. P. Examination of synovial fluid as a diagnostic aid in arthritis. **The Medical Clinics of North America**, v. 50, n. 5, p. 1281-1293, 1966.

HOPPER, B. J.; STEEL, C.; RICHARDSON, J. L.; ALEXANDER, G. R.; ROBERTSON, I. D. Radiographic evaluation of sclerosis of the third carpal bone associated with exercise and the development of lameness in Standardbred horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 5, p. 441-446, 2004.

IRIE, K.; UCHIYAMA, E.; IWASO, H. Intraarticular inflammatory cytokine in acute anterior cruciate ligament injured knee. **The Knee**, v. 10, p. 93-96. 2003.

IWANAGA, T.; SHIKICHI, M.; KITAMURA, H.; YANASE, H.; NOZAWA-INOUE, K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. **Archives of Histology and Cytology**, v. 63, n. 1, p. 17-31, 2000.

KARIM, A.; WAKEFIELD, R. J.; QUINN, M.; CONAGHAN, P. G.; BROWN, A. K.; VEALE, D. J., O'CONNOR, P.; REECE, R.; EMERRY, P. Validation and reproducibility of ultrasonography in the detection of synovitis in the knee. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 2, p. 387-394, 2004.

KIRKER-HEAD, C. A.; CHANDNA, V. K.; AGARWAL, R. K.; MORRIS, E. A.; TIDWELL, A.; O'CALLAGHAN, M. W.; 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.

KLING, D. H. The nature and origin of synovial fluid. **Archives of Surgery**, v. 23, p. 543, 1931.

LEDGERWOOD, E. C.; POBER, J. S.; BRADLEY, J. R. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. **Laboratory Investigation**, v. 79, n. 9, p. 1041-1050, 1999.

LEVICK, J. R. Synovial fluid and trans-synovial flow in stationary and moving normal joints. In: HELMINEN, H. J.; KIVIRANTA, I.; TAMMI, M. SÄÄMÄNEN A-M; PAUKKONEN, K.; JURVELIN, J. **Joint loading. Biology and health of articular structures**. Bristol: Wright, 1987. p.149-186.

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, p. 162-170, 2005.

LOHMANDER, L. S. Articular cartilage and osteoarthritis: the role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease. **Journal of Anatomy**, v. 184, p. 477-492, 1994.

LOHMANDER, L. S.; FELSON, D. T. Defining the role of molecular markers to monitor disease, intervention, and cartilage breakdown in osteoarthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 24, p. 782-785, 1997.

MacWILLIAMS, P. S.; FRIEDRICHS, K. R. Laboratory evaluation and interpretation of synovial fluid. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 33, p. 153-178, 2003.

MAHAFFEY, E. A. Synovial fluid. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D. **Cytology and hematology of the horse**. Goleta: American Veterinary, 1992. p.153-161.

MAINI, R. N. The role of tumor necrosis factor in rheumatoid arthritis. In: Van den BERG, W.B.; MIOSSEC, P. **Cytokine and joint injury**. Birkhäuser Verlag: Basel, 2004. p.1-28.

MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J-P.; FAHMI, H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 33, n. 3, p. 155-167, 2003.

MAY, S. A. Cytokines in the pathogenesis of equine joint disease. In: SCHIJNS, V. E. C. J.; HORZINEK, M. C. **Cytokines in veterinary medicine**. CAB International, 1997. p.191-199.

McILWRAITH, C. W. Doenças das articulações, tendões, ligamentos e estruturas relacionadas. In: STASHAK, T. S. **Claudicação em eqüinos segundo Adam's**. 4.ed. São Paulo: Roca, 1994. p. 350-502

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

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.

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.

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. 59-63, 1990.

MYERS, S. L.; BRANDT, K. D.; EHLICH, J. W.; BRAUSNTEIN, E. M., SHELBOURNE, K. D.; HECK, D.A.; KALASINSKI, L. A. Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. **Journal of Rheumatology**, v. 24, p. 365-371, 1997.

NAREDO, E.; CABERO, F.; PALOP, M. J.; COLLADO, P.; CRUZ, A.; CRESPO, M. Ultrasonographic findings in knee osteoarthritis: A comparative study with clinical and radiographic assessment. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, p. 568-574, 2005.

NIEMINEN, H. J.; TÖYRÄS, J.; RIEPPO, J.; NIEMINEN, M. T.; HIRVONEN, J.; KORHONEN, R.; JURVELIN, J. S. Real-time ultrasound analysis of articular cartilage degradation *in vitro*. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v.28, p.519-525, 2002.

NILSSON, G.; PERSSON, L. Changes in the synovial fluid of equine fetlock joints with lesions in the cartilage and joint capsule. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, p. 99-107, 1973.

PALMER, J. L.; BERTONE, A. L. Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, p. 263-277, 1994.

PARK, D. P.; LEBEL, J. L. Radiologia nos eqüinos. In: STASHAK, T.S. **Claudicação em eqüinos segundo Adam's**. São Paulo: Rocca, 1994. p.160-192.

PENNINX, B. W. J. H.; ABBAS, H.; AMBROSIUS, W.; NICKLAS, B. J.; DAVIS, C.; MESSIER, S. P.; PAHOR, M. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 10, p. 2027-2031, 2004.

PERSSON, L. On the synovia in horses. A clinical and experimental study. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p. 7-77, 1971. (Supplementum, 35).

POPOT, M. A.; BONNAIRE, Y.; GUÉCHOT, J.; TOUTAIN, P. L. Hyaluronan in horses: physiological production rate, plasma and synovial fluid concentrations in control conditions and following sodium hyaluronate administration. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 6, p. 482-487, 2004.

PRADELLES, P.; GRASSI, J.; MACLOUF, J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 1170-1173, 1985.

RASERA, L. **Avaliações radiográfica e ultra-sonográfica da articulação metacarpofalangeana em eqüinos após instabilidade articular induzida cirurgicamente**. 2002. 80f. Dissertação (Mestrado em cirurgia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2002.

VON RECHENBERG, B.; McILWRAITH, C. W.; AKENS, M. K.; FRISBIE, D. D.; LEUTENEGGER, C.; AUER, J. A. Spontaneous production of nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE₂) and neutral metalloproteinases (NMPs) in media of explants cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 2, p. 140-150, 2000.

RHINELANDER, F. W.; BENNETT, G. A.; BAUER, W. Exchange of substances in aqueous solution between joints and the vascular system. **Journal of Clinical Investigation**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 1939.

ROPES, M. W.; BENNETT, G. A.; BAUER, W. The origin and nature of normal synovial fluid. **Journal of Clinical Investigation**, v. 18, n. 3, p. 351-372, 1939.

ROSSDALE, P. D.; HOPES, R.; DIGBY, N. J.; OFFORD, K. Epidemiological study of wastage among racehorses, 1982-1983. **Veterinary Record**, v. 116, p. 66-70, 1985.

ROVATI, L. C. Radiographic assessment. Introduction: existing methodology. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 7, p. 427-429, 1999.

SAARAKKALA, S.; TÖYRÄS, J.; HIRVONEN, J.; LAASANEN, M. S.; LAPPALAINEN, R.; JURVELIN, J. S. Ultrasonic quantitation of superficial degradation of articular cartilage. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 30, n. 6, p. 783-792, 2004.

SALLES-GOMES, T. L. **Reparação da lesão incisional da porção fibrosa da cápsula articular de eqüinos: aspectos clínicos, histológicos, bioquímicos e ultra-sonográficos**. 2001. 74 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2001.

SCHLAAK, J. F.; PFERS, I.; MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.-H.; MÄRKER-HERMANN, E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropaties. **Clinical Experimental Rheumatology**, v. 14, p. 155-162, 1996.

SCHUERWEGH, A. J.; DOMBRECHT, E. J.; STEVENS, W. J.; VAN OFFEL, J. F.; BRIDTS, C. H.; DE CLERK, L. S. Influence of pro-inflammatory (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokine on chondrocyte function. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, p. 681-687, 2003.

SHIKICHI, M.; KITAMURA, H. P.; YANASE, H.; KONNO, A.; TAKAHASHI-IWANAGA, H.; IWANAGA, T. Three-dimensional ultrastructure of synoviocytes in the horse joint as revealed by the scanning electron microscope. **Archives of Histology and Cytology**, v. 62, n. 3, p. 219-229, 1999.

STASHAK, T. S. Examination for lameness. In: _____. **Adam's lameness in horses**. 5. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2002. p. 113 –183.

STRAND, E.; MARTIN, G. S.; CRAWFORD, M. P.; KAMERLING, S. G.; BURBA, D. J.; KEARNEY, M. T. Intra-articular pressure, elastance, and range of motion in flexion of the equine metacarpophalangeal joint. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 10, p. 1362-1371, 1995.

SUGIUCHI, H.; ANDO, Y.; MANABE, M.; NAKAMURA, E.; MIZUTA, H.; NAGATA, S.; OKABE, H. Measurement of total and differential white blood cell counts in synovial fluid by means of an automated hematology analyzer. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 1, p. 36-47, 2005.

THONAR, E. J.-M. A. Molecular markers of metabolic changes in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 7, n. 3, p. 338-339, 1999.

TODHUNTER, R. J. Diagnostic principles of joint disease. In: AUER, A.A. **Equine surgery**. Philadelphia: Saunders Company, 1992. p.866-883.

TOMLINSON, J. E.; REDDING, W. R.; SAGE, A. Ultrasonographic evaluation of tarsocrural joint cartilage in normal adult horses. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 41, n. 5, p. 457-460, 2000.

TROTTER, G. W.; McILWRAITH, C. W.; NORR DIN, R. W.; TURNER, A. S. Degenerative joint disease with osteochondrosis of the proximal interphalangeal joint in young horse. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 11, p. 1312-1318, 1982.

TRUMBLE, T. N.; TROTTER, G. W. OXFORD, J. R.; McILWRAITH, C. W.; CAMMARATA, S.; GOODNIGHT, J. L.; BILLINGHURST, C.; FRISBIE, D. D. Synovial fluid gelatinase concentration and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occur joint disease in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 9, p. 1467-1477, 2001.

TULAMO, R-M.; HEISKANEN, T.; SALONEN, M. Concentration and molecular weight distribution of hyaluronate in synovial fluid from clinically normal horses and horses with diseased joints. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 5, p. 710-715, 1994.

TULAMO, R-M.; HOUTTU, J.; TUPAMÄKI, A.; SALONEN, M. Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 6, p. 932-937, 1996.

TULAMO, R-M.; SAARI, H.; KONTTINEN, Y. T. Determination of concentration of hyaluronate in equine serum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 740-742, 1990.

VAN DEN BERG, W. B. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. **Arthritis Research**, v. 3, p. 18-26, 2001.

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

VAN DEN BOOM, R.; VAN DE LEST, C. H.; BULL, S.; BRAMA, R. A.; 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. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 1, p. 91-95, 1974.

VIGNON, E.; CONROZIER, T.; PIPERNO, M.; RICHARD, S.; CARRILLON, Y.; FANTINO, O. Radiographic assessment of hip and knee osteoarthritis. Recommendations: recommended guidelines. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 7, p. 434-436, 1999.

WARREN, C. F.; BENNETT, G. A.; BAUER, W. The significance of the cellular variations occurring in normal synovial fluid. The **American Journal of Pathology**, v. 11, p. 953-968, 1935.

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**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 488-520.

WOLLENMAN, P.; McMAHON, P. J.; KNAPP, S.; ROSS, M. W. Lameness in the polo pony. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. St. Louis: Saunders Company, 2003. p. 572-591.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Valores médios e desvio padrão da circunferência articular (cm) das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

DIAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	26,92	27,00	27,63
40	26,95	26,66	27,96
80	26,90	26,37	27,75
120		26,58	27,75
160		27,21	27,28
200		27,17	27,59
240	27,42	26,83	27,57
280	26,87	26,37	27,62
320		26,85	27,50
360	26,58	27,25	28,07
MÉDIA	26,94a	26,83a	27,67b
DP	0,27	0,33	0,23

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas ($P<0,05$).

Valores médios e desvio padrão da proteína total plasmática (g/dL) dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	6,63	6,75	6,42
160		6,17	5,99
200		6,33	5,79
240	6,55	6,26	6,62
280		6,11	6,65
320		5,45	6,86
360	6,73	6,25	7,15
MÉDIA	6,64a	6,19a	6,50a
DP	0,09	0,39	0,48

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

APÊNDICE B

Valores médios e desvio padrão da glicose plasmática (mg/dL) dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
zero	105,17	88,50	92,75
160		99,80	92,13
200		91,80	97,00
240	84,00	87,00	100,57
280		99,30	84,63
320		95,80	79,00
360	78,00	108,80	93,86
MÉDIA	89,06a	95,86a	91,42a
DP	14,27	7,57	7,34

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para a coloração do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

ESCORES	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
1	51 (79,58%)	61 (59,22%)	63 (38,87%)	175
2	6 (9,37%)	31 (30,09%)	78 (49,37%)	115
3	7 (10,93%)	11 (10,67%)	17 (10,75%)	35
TOTAL	64 (100%)	103 (100%)	158 (100%)	

APÊNDICE C

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para o aspecto do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

ESCORES	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
1	59 (93,65%)	86 (82,69%)	108 (69,23)	253
2	4 (6,34%)	17 (13,34%)	43 (27,56%)	64
3	0 (0%)	1 (0,96%)	5 (3,20%)	6
TOTAL	63 (100%)	104 (100%)	156 (100%)	

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para a qualidade do precipitado de mucina do líquido sinovial das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

ESCORES	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
1	22 (53,65%)	27 (42,18%)	60 (39,47%)	109
2	16 (39,02)	30 (46,87%)	60 (39,47%)	106
3	3 (7,31%)	7 (10,93)	25 (16,44%)	35
4	0 (0%)	0 (0%)	7 (4,60%)	7
TOTAL	41 (100%)	64 (100%)	152 (100%)	

APÊNDICE D

Valores médios e desvio padrão do volume (mL) de líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	2,92	3,66	4,78
40	3,12	3,10	4,81
80	3,57	2,47	4,37
120		2,00	5,17
160		3,93	5,43
200		3,60	5,45
240	5,10	3,38	5,89
280	4,73	2,83	5,71
320		4,67	5,82
360	4,64	5,09	6,34
MÉDIA	4,01a	3,47a	5,38b
DP	0,92	0,95	0,60

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas ($P<0,05$).

Valores médios e desvio padrão do número total de células nucleadas (cél/ μ L) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	107,00	197,77	153,75
40	111,42	356,25	154,66
80	180,09	383,63	110,62
120		196,36	60,00
160		224,28	130,62
200		200,00	261,87
240	238,33	223,33	274,37
280	205,00	136,66	217,50
320		180,00	153,75
360	90,00	240,00	254,16
MÉDIA	155,31a	233,83a	177,13a
DP	60,83	77,36	71,57

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

APÊNDICE E

Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de neutrófilos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	24,60	11,83	13,25
40	29,50	11,50	10,85
80	33,37	25,16	22,00
120		12,66	9,68
160		13,50	3,68
200		21,00	9,31
240	4,66	5,75	6,86
280	9,54	9,25	11,00
320		6,08	17,26
360	9,58	5,41	15,38
MÉDIA	18,54a	12,21a	11,93a
DP	12,09	6,51	5,28

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de linfócitos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	45,80	45,75	49,42
40	53,25	47,66	32,07
80	34,14	40,81	35,50
120		35,71	56,81
160		37,80	52,81
200		38,90	54,81
240	59,50	41,91	55,71
280	54,57	59,25	47,81
320		51,83	52,25
360	55,00	41,45	48,76
MÉDIA	50,38a	44,11b	48,60ab
DP	9,11	7,18	8,39

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas ($P<0,05$).

APÊNDICE F

Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de monócitos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	23,20	38,00	34,14
40	1,75	36,33	50,28
80	30,00	30,63	32,92
120		35,14	25,93
160		26,40	32,75
200		32,40	30,93
240	33,25	33,00	30,28
280	28,11	27,83	33,12
320		31,91	27,31
360	28,11	43,63	31,15
MÉDIA	24,07a	33,53a	32,88a
DP	11,41	5,04	6,64

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas (P>0,05).

Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de macrófagos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paul - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	1,40	2,58	0,28
40	0,00	3,33	5,92
80	0,33	0,00	1,42
120		0,42	0,68
160		2,60	5,06
200		1,20	2,25
240	2,50	6,75	3,92
280	1,08	1,33	2,40
320		8,08	0,87
360	0,66	2,63	4,07
MÉDIA	1,00a	2,89b	2,69b
DP	0,89	2,63	1,96

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas (P>0,05).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas (P<0,05).

APÊNDICE G

Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de sinoviócitos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	2,00	1,33	1,14
40	4,00	1,16	0,64
80	0,77	0,63	4,64
120		4,57	6,88
160		0,20	3,63
200		2,30	2,56
240	0,08	12,33	2,93
280	0,91	2,25	2,00
320		1,25	1,25
360	0,66	3,63	0,62
MÉDIA	1,40a	2,97b	2,63b
DP	1,42	3,55	1,99

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas ($P<0,05$).

Valores médios e desvio padrão do número relativo (%) de eosinófilos do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	1,80	0,00	0,14
40	0,00	0,00	0,00
80	1,67	0,36	0,29
120		2,14	0,00
160		0,60	0,19
200		0,00	0,13
240	0,00	0,00	0,13
280	0,00	0,08	0,00
320		0,33	0,00
360	0,00	0,18	0,00
MÉDIA	0,58a	0,37a	0,09a
DP	0,90	0,66	0,10

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

APÊNDICE H

Valores médios e desvio padrão da proteína total (g/dL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	0,71	1,01	0,78
40	0,88	1,29	1,64
80	0,93	0,99	1,09
120		0,94	1,56
160		1,44	1,15
200		1,21	1,51
240	0,87	1,46	1,44
280	0,77	1,15	1,06
320		1,45	0,87
360	1,07	1,45	1,54
MÉDIA	0,87a	1,23b	1,26b
DP	0,13	0,21	0,31

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas ($P<0,05$).

Valores médios e desvio padrão da glicose (mg/dL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	87,00	105,92	103,87
40	96,80	106,00	106,56
80	87,33	89,33	100,50
120		81,33	99,75
160		99,11	97,46
200		92,75	97,93
240	102,54	83,81	92,62
280	78,90	98,00	81,06
320		111,11	75,43
360	73,60	100,77	91,57
MÉDIA	87,70a	96,81b	94,68b
DP	10,77	9,86	9,85

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas ($P<0,05$).

APÊNDICE I

Valores médios e desvio padrão da concentração de PGE₂ (pg/mL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	69,35		63,18
40	55,69	77,01	53,50
80	91,90	25,74	48,84
120		37,10	54,26
160		63,67	82,61
200		41,83	63,79
240	41,95	39,61	87,69
280	25,54	65,54	113,34
320		45,81	83,53
360	43,46	52,39	90,29
MÉDIA	54,65ab	49,86a	74,10b
DP	23,40	16,24	20,63

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas (P>0,05).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas (P<0,05).

Valores médios e desvio padrão da concentração de TNF- α (ng/mL) líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

COLETAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	407,36	474,87	774,43
40	822,25	1048,88	397,39
80	558,65	660,71	674,33
120		780,21	374,00
160		231,80	406,83
200		388,58	1265,57
240	254,16	373,60	442,45
280	667,91	466,06	
320		1019,04	1198,87
360	652,83	565,75	512,11
MÉDIA	560,53a	600,95a	671,78a
DP	202,92	274,78	345,18

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas (P>0,05).

APÊNDICE J

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para a extensão da marcação do receptor do tipo II de TNF- α nas células do líquido sinovial, através da técnica de imunocitoquímica, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

ESCORES	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
1	10 (43,47%)	3 (13,04%)	7 (31,81%)	20
2	13 (56,52%)	10 (43,47%)	14 (63,63%)	37
3	0 (0%)	9 (39,13%)	1 (4,54%)	10
4	0 (0%)	1 (4,34%)	0 (0%)	1
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
TOTAL	23 (100%)	23 (100%)	22 (100%)	

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para a intensidade da marcação do receptor do tipo II de TNF- α nas células do líquido sinovial, através da técnica de imunocitoquímica, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

ESCORES	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
1	16 (69,56%)	4 (17,39%)	8 (36,36%)	28
2	7 (30,43%)	16 (69,56%)	13 (59,09%)	36
3	0 (0%)	3 (13,04%)	1 (4,54%)	4
TOTAL	23 (100%)	23 (100%)	22 (100%)	

APÊNDICE K

Número total de articulações e porcentagem (%) do escore total de marcação para o receptor do tipo II de TNF- α nas células do líquido sinovial, através da técnica de imunocitoquímica, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

ETM	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
2	6 (26,08%)	3 (13,04%)	4 (18,18%)	13
3	14 (60,86%)	1 (4,34%)	6 (27,27%)	21
4	3 (13,04%)	7 (30,43%)	11 (50%)	21
5	0 (0%)	11 (47,82%)	1 (4,54%)	12
6	0 (0%)	1 (4,34%)	0 (0%)	1
7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
8	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
TOTAL	23 (100%)	23 (100%)	22 (100%)	

Valores médios e desvio padrão da espessura da cápsula articular fibrosa dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeas no sentido transversal, obtidos através do exame ultrassonográfico, nos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

DIAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	0,75	0,69	1,06
210	0,83	0,94	0,94
360	0,82	0,93	0,88
MÉDIA	0,80a	0,85a	0,96b
DP	0,04	0,14	0,09

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P > 0,05$).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

APÊNDICE L

Valores médios e desvio padrão da espessura da cápsula articular fibrosa dorsal (cm) das articulações metacarpofalangeas no sentido longitudinal, obtidos através do exame ultra-sonográfico, nos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

DIAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	0,91	0,89	1,12
210	0,81	0,99	0,96
360	0,84	0,97	0,95
MÉDIA	0,85a	0,95ab	1,01b
DP	0,05	0,05	0,10

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas ($P<0,05$).

Valores médios e desvio padrão da espessura do ligamento anular (cm) das articulações metacarpofalangeas no sentido transversal, obtidos através do exame ultra-sonográfico, nos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

DIAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	0,18	0,10	0,21
210	0,14	0,22	0,14
360	0,09	0,13	0,12
MÉDIA	0,14a	0,15a	0,16a
DP	0,05	0,06	0,05

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

APÊNDICE M

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para grau de homogeneidade da cápsula articular fibrosa dorsal das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através do exame ultra-sonográfico, nos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

ESCORES	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
1	27 (77,14%)	15 (41,66%)	9 (19,56%)	51
2	8 (22,85%)	19 (52,77%)	37 (80,43%)	64
3	0 (0%)	2 (5,55%)	0 (0%)	2
TOTAL	35 (100%)	36 (100%)	46 (100%)	

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para acúmulo de líquido sinovial nas articulações metacarpofalangeanas, obtidos através do exame ultra-sonográfico, nos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

ESCORES	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
1	19 (52,77%)	20 (55,55%)	31 (67,39%)	70
2	17 (47,22%)	16 (44,44%)	15 (32,60%)	48
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
TOTAL	36 (100%)	36 (100%)	46 (100%)	

APÊNDICE N

Número total de articulações e porcentagem dos escores para alterações dos tecidos moles periarticulares das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através do exame radiográfico, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

ESCORE	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
0	36 (100%)	34 (73,91%)	18 (20,03%)	88
1	0 (0%)	10 (21,73%)	43 (69,35%)	53
2	0 (0%)	2 (4,34%)	0 (0%)	2
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
5	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,61%)	1
TOTAL	36 (100%)	46 (100%)	62 (100%)	

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para presença de osteófitos nas articulações metacarpofalangeanas, obtidos através do exame radiográfico, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias analisados - São Paulo - 2007.

ESCORES	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
0	30 (83,33%)	26 (56,52%)	31 (50%)	87
1	6 (16,66%)	20 (43,47%)	9 (14,51%)	35
2	0 (0%)	0 (0%)	14 (22,58%)	14
3	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,61%)	1
4	0 (0%)	0 (0%)	6 (9,67%)	6
5	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,61%)	1
TOTAL	36 (100%)	46 (100%)	62 (100%)	

APÊNDICE O

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para esclerose do osso subcondral das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através do exame radiográfico, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias zero, 210 e 360 - São Paulo - 2007.

ESCORE	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
0	36 (100%)	38 (82,60%)	27 (43,54%)	101
1	0 (0%)	8 (17,40%)	22 (35,48)	30
2	0 (0%)	0 (0%)	12 (19,35%)	12
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
5	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,61%)	1
TOTAL	36 (100%)	46 (100%)	62 (100%)	

Valores médios do ângulo de flexão (°) das articulações metacarpofalangeanas, obtidos através do exame radiográfico, dos animais do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, nos dias zero, 210 e 360 - São Paulo - 2007.

DIAS	CONTROLE	GRUPO 1	GRUPO 2
Zero	127,83	131,00	136,00
120		130,66	136,75
210	127,66	132,83	139,00
360	130,00	132,00	138,85
MÉDIA	128,50a	131,62a	137,65b
DP	1,30	0,99	1,50

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas (P>0,05).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas (P<0,05).

APÊNDICE P

Valores da concentração da proteína total plasmática (g/dL) dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

COLETAS				
Animal	M0	3h	6h	24h
1	7,4	6,334	5,996	6,656
2	7,491	6,157	6,691	5,96
3	6,739	6,155	5,912	5,878
4	7,242	6,489	6,592	7,496
MÉDIA	7,22a	6,28a	6,29a	6,49a
DP	0,34	0,16	0,40	0,75

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Valores da concentração da glicose plasmática (g/dL) obtido dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

COLETAS				
Animal	M0	3h	6h	24h
1	115	101	108	107
2	122	91	91	100
3	105	96	81	101
4	115	71	92	97
MÉDIA	114,25a	89,75b	93,00b	101,25a
DP	6,99	13,15	11,17	4,19

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

APÊNDICE Q

Número total de articulações e porcentagem (%) do escore para coloração do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

COLETAS					
Escore	M0	3 h	6 h	24 h	TOTAL
1	8 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8
2	0 (0%)	3 (37,5%)	4 (50%)	8 (100%)	15
3	0 (0%)	5 (62,5%)	4 (50%)	0 (0%)	9
TOTAL	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para aspecto do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

COLETAS					
Escore	M0	3 h	6 h	24 h	TOTAL
1	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	32
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
TOTAL	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	

APÊNDICE R

Valores do volume (mL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

COLETAS				
Articulação	M0	3 h	6 h	24 h
1	7,0	2,5	2,0	8,0
2	5,4	2,0	2,0	8,0
3	3,9	1,5	2,5	5,0
4	5,4	4,0	3,2	4,0
5	9,0	6,0	7,0	8,0
6	5,0	2,0	3,2	7,0
7	2,6	1,5	1,0	6,0
8	5,0	4,3	3,8	4,0
MÉDIA	5,41a	2,97b	3,08b	6,25a
DP	1,92	1,62	1,80	1,75

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas ($P<0,05$).

Valores do número total de células nucleadas (cél/ μ L) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

COLETAS				
Articulação	M0	3h	6h	24h
1	240	400	360	100
2	230	190	80	100
3	130	40	30	160
4	50	110	10	280
5	50	170	280	300
6	160	50	70	90
7	140	310	100	200
8	40	50	40	30
MÉDIA	130a	165a	121,25a	157,50a
DP	79,28	132,02	127,78	96,02

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas ($P>0,05$).

APÊNDICE S

Valores da concentração da proteína total (g/dL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

COLETAS				
Articulação	M0	3h	6h	24h
1	0,608	1,832	1,922	1,99
2	0,538	1,249	1,271	2,56
3	1,036	1,336	1,413	1,345
4	1,289	1,181	1,42	1,117
5	1,795	2,138	2,557	1,788
6	1,752	2,116	2,493	1,592
7	0,937	1,717	1,819	2,412
8	0,67	1,4	1,38	2,321
MÉDIA	1,08a	1,62ab	1,78b	1,89b
DP	0,49	0,38	0,51	0,52

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas (P>0,05).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas (P<0,05).

Valores da concentração da glicose (mg/dL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

COLETAS				
Articulação	M0	3h	6h	24h
1	105			88
2	117	86	104	98
3	119	101	79	95
4	129		91	103
5	120		90	93
6	129			105
7	115	81	84	89
8	116	68	87	84
MÉDIA	118,75a	84,00b	89,17b	94,38b
DP	7,80	13,64	8,47	7,37

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas (P>0,05).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas (P<0,05).

APÊNDICE T

Valores da concentração de PGE₂ (pg/mL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

COLETAS				
Articulação	M0	3h	6h	24h
1	126,80	1135,20	1127,60	324,20
2	108,30	143,91	152,00	102,30
3	55,73	378,20	600,60	71,55
4	150,47	845,30	604,60	139,69
5	107,30	450,20	231,90	311,40
6	131,63	196,10	399,10	201,40
7	76,50	592,60	360,90	151,59
8	66,92	432,50	335,20	159,69
MÉDIA	102,96a	521,75b	476,49bc	182,73ac
DP	33,65	331,35	307,10	91,89

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas (P>0,05).

Para letras diferentes médias estatisticamente significativas (P<0,05).

Valores da concentração de TNF- α (ng/mL) do líquido sinovial obtido nas coletas das articulações metacarpofalangeanas dos animais atletas, antes (M0) e às 3, 6 e 24 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

COLETAS				
Articulação	M0	3h	6h	24h
1	2194		1527	1562
2	582	326	328	
3			744	1005
4	751	222		640
5	786	1266	756	870
6				
7	658			587
8	983	326		431
MÉDIA	992,33a	535,00a	838,75a	849,17a
DP	604,16	489,79	500,13	405,02

Para letras iguais médias estatisticamente não significativas (P>0,05).

APÊNDICE U

Número total de articulações e porcentagem (%) dos escores para a extensão, intensidade e escore total de marcação (ETM) do receptor do tipo 2 de TNF- α nas células do líquido sinovial, através da técnica de imunocitoquímica, dos animais atletas às 3 e 6 horas após o término do jogo de pólo - São Paulo - 2007.

Extensão da marcação			Intensidade da marcação			ETM		
Escore	COLETAS		Escore	COLETAS		Escore	COLETAS	
	3 h	6 h		3 h	6 h		3 h	6h
0	0	0	0	0	0	3	0	0
	(0%)	(0%)		(0%)	(0%)		(0%)	(0%)
1	0	0	1	0	0	4	0	0
	(0%)	(0%)		(0%)	(0%)		(0%)	(0%)
2	0	0	2	0	0	5	0	0
	(0%)	(0%)		(0%)	(0%)		(0%)	(0%)
3	1	4	3	4	4	6	1	4
	(25%)	(100%)		(100%)	(100%)		(25%)	(100%)
4	3	0	4	0	0	7	3	0
	(75%)	(0%)		(0%)	(0%)		(75%)	(0%)
5	0	0	5	0	0	8	0	0
	(0%)	(0%)		(0%)	(0%)		(0%)	(0%)
TOTAL	4	4	TOTAL	4	4	TOTAL	4	4
	(100%)	(100%)		(100%)	(100%)		(100%)	(100%)