PATRÍCIA MONACO BROSSI

Investigação laboratorial dos efeitos antioxidantes do plasma processado
autólogo nas principais enfermidades articulares de equinos
após tratamento artroscópico

São Paulo

2014

PATRÍCIA MONACO BROSSI

Investigação laboratorial dos efeitos antioxidantes do plasma processado autólogo nas principais enfermidades articulares de equinos após tratamento artroscópico

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

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

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

São Paulo

2014

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.2954
FMVZ

Brossi, Patrícia Monaco
Investigação laboratorial dos efeitos antioxidantes do plasma processado autólogo nas principais
enfermidades articulares de equinos após tratamento artroscópico / Patrícia Monaco Brossi. -- 2014.
286 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

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

1. Equino. 2. Líquido sinovial. 3. Hemoderivado. 4. Estresse oxidativo. 5. Plasma processado
autólogo. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Investigação laboratorial dos efeitos antioxidantes do plasma processado autólogo nas principais enfermidades articulares de equinos após tratamento artroscópico", protocolado sob o nº 2399/2011, utilizando 40 (quarenta) equídeos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/11/2012.

São Paulo, 20 de março de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BROSSI, Patrícia Monaco

Título: Investigação laboratorial dos efeitos antioxidantes do plasma processado autólogo nas principais enfermidades articulares de equinos após tratamento artroscópico.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. D.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ângela e Elcio, dedico este trabalho.

Com muito amor.

DEDICATÓRIA

Ricardo, meu amor, uma página toda sua.

Por tudo que não cabe em palavras.

AGRADECIMENTOS

À Flávia, minha amiga e companheira, com quem eu tenho todo o orgulho do mundo de compartilhar a profissão. Este trabalho não teria sido possível sem a sua gentileza, compreensão e participação. De coração, obrigada por ter cuidado com tanto profissionalismo e com tanto amor dos “*nossos*” cavalos. De verdade, agradeço, desejando que você tenha crescido junto comigo, durante este processo.

À Thaís Machado pelo apoio moral e laboratorial, sem nenhum dos quais eu teria chegado até aqui.

À Juliana Moreira, pela incansável ajuda nas contagens de células, tabelas, gráficos e pelo sorriso de sempre.

Ao professor Luís Cláudio L. C. Silva, pelo auxílio e participação neste projeto.

Ao professor Wilson Roberto Fernandes pelas discussões improvisadas e pelos eventuais cigarros.

À professora Carla Belli pelo carinhoso suporte energético. Grande potinho de balas!

A todos os residentes que passaram pelo Hospital Veterinário, durante o período de coleta de amostras, por toda a ajuda e paciência.

Aos funcionários do Hospital, Marquinhos, Henrique e Cícero pela presteza, simpatia, boa vontade e cafezinho com que sempre me receberam.

Aos queridos colegas de pós, Cris, Marilene, Maurício, Ana Guiomar, Renata, Joyce, Mônica, Fernanda, Dayane, Talissa, Ana Paula e a todos os demais com quem tive a alegria e o prazer de conviver.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À filha Augusta, pelo amor e ajuda de sempre.

À minha orientadora, Prof^ª Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, por ter acreditado neste trabalho e principalmente por ter me propiciado a vivência das experiências do doutorado.

Elas definitivamente deram novo rumo à minha vida, a minha formação profissional e pessoal, contribuindo para o meu desenvolvimento.

EPIÍGRAFE

“Você precisa aprender o mais rápido possível a relaxar e deixar que tudo seja como é. De que vale a ansiedade, de que vale a expectativa, se depois de cada conquista surgem logo novas possibilidades? Olhe mais para si mesmo, para seu íntimo e para suas reais necessidades.”

Horóscopo de “Caras”, n. 44 - 2013

RESUMO

BROSSI, P. M. Investigação laboratorial dos efeitos antioxidantes do plasma processado autólogo nas principais enfermidades articulares de equinos após tratamento artroscópico. [Laboratorial evaluation of the antioxidant effects of autologous processed plasma in equine articular diseases after arthroscopic surgery]. 2014. 286 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Dada sua natureza cursorial, a espécie equina depende da livre movimentação para o desempenho de atividades diárias e para sobrevivência. Esta habilidade natural para o movimento é explorada em alto grau durante a prática esportiva, razão da existência de grande parte dos criatórios e centros de treinamento. Enfermidades articulares, como a osteoartrite e a osteocondrose, que reduzam ou causem prejuízo permanente à mobilidade e ao desempenho atlético são um desafio terapêutico. Os hemoderivados autólogos surgiram como opções acessíveis e seguras para o tratamento destas afecções articulares e apesar de amplamente difundido, seu emprego acontece a despeito de lacunas no conhecimento dos métodos ideais de preparação e administração, bem como dos mecanismos de ação destes produtos derivados do sangue. As propriedades antioxidantes do plasma processado autólogo demonstradas *in vitro*, em estudo utilizando células de líquido sinovial equino previamente estimuladas, motivaram a realização deste estudo com o objetivo de verificar os efeitos deste hemoderivado, *in vivo*, em articulações de equinos com osteoartrite ou osteocondrose. Tais propriedades despertaram também o interesse em verificar a ocorrência de eventos relacionados ao estresse oxidativo nestas enfermidades, o que justificaria seu emprego na clínica ortopédica. Para tal fim, líquido sinovial foi obtido antes da abordagem cirúrgica de articulações acometidas pela osteoartrite ou osteocondrose, para análise do perfil oxidante/antioxidante, físico, celular, molecular e inflamatório. Após o término da artroscopia, um grupo de animais recebeu injeção intra-articular do plasma processado autólogo e outro grupo não recebeu nenhuma medicação intra-articular, servindo como controle. Quarenta e oito horas após a cirurgia, nova amostra de líquido sinovial foi coletada, e as mesmas análises foram realizadas. As análises físicas e a contagem de células totais foram realizadas imediatamente após as coletas. O sobrenadante resultante da centrifugação do líquido sinovial foi congelado a -80° C para análises posteriores. Elas consistiram nas dosagens da catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, capacidade antioxidante total, vitamina E, proteína carbonil, condroitim sulfato, ácido hialurônico, prostaglandina E₂,

proteína total e ureia. Em relação à caracterização das enfermidades, as articulações acometidas por osteoartrite apresentaram maiores concentrações de catalase e de vitamina E, refletindo maior ativação dos sistemas de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos nesta enfermidade. A osteoartrite apresentou, ainda, natureza mais inflamatória, quando comparada à osteocondrose, com concentrações mais elevadas de prostaglandina E₂ e proteína total, além de maiores contagens de células totais no líquido sinovial das articulações afetadas. No entanto, a osteocondrose apresentou caráter mais destrutivo em relação aos componentes da matriz extracelular e do líquido sinovial, com concentrações superiores de condroitim sulfato e ácido hialurônico, respectivamente, no líquido sinovial destas articulações. Os resultados demonstraram a ocorrência de estresse oxidativo no período pós-operatório através da ativação das defesas antioxidantes enzimáticas, com aumento da concentração de catalase. O tratamento com o plasma processado autólogo levou a aumento das concentrações de vitamina E no líquido sinovial, incrementando o sistema de defesa antioxidante não enzimático. Não foram observados efeitos do tratamento sobre o metabolismo da cartilagem articular ou biomarcadores inflamatórios. Pode-se inferir que o plasma processado autólogo apresenta potencial terapêutico no combate ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Equino. Líquido sinovial. Hemoderivado. Estresse oxidativo. Plasma processado autólogo.

ABSTRACT

BROSSI, P. M. Laboratorial evaluation of the antioxidant effects of autologous processed plasma in equine articular diseases after arthroscopic surgery. [Investigação laboratorial dos efeitos antioxidantes do plasma processado autólogo nas principais enfermidades articulares de equinos após tratamento artroscópico]. 2014. 286 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

As a cursorial animal, the horse relies on soundness to fully accomplish daily life activities and survival. Horses' natural ability for movement justifies breeding and training investments, and is explored to its maximum during athletic activities. Articular disorders, such as osteoarthritis and osteochondrosis, with their potential to reduce physical performance, are a therapeutic challenge. Autologous haemoderivates have appeared as safe and accessible options for the management of these conditions, but their widespread use has outpaced scientific evidence regarding mechanisms of action and ideal methods for preparation and administration. The antioxidant properties of autologous processed plasma, previously demonstrated *in vitro* on stimulated equine synovial fluid cells, posed a question on whether these effects would occur *in vivo*. Therefore, the present study aimed to verify autologous processed plasma's effects in osteoarthritic and osteochondritic joints, when administered at the end of the arthroscopic procedure, with particular emphasis on possible antioxidant attributes. The study also aimed to detect evidences of oxidative stress in these disorders, what could further justify its use. For this purpose, synovial fluid was obtained immediately before the beginning of the surgery, and analyzed to yield an oxidant/ antioxidant, physical, cellular, molecular and inflammatory profile of osteoarthritis and osteochondrosis. After the end of the procedure, one group of horses received the intraarticular medication and another group of untreated horses served as controls. Forty-eight hours after surgery synovial fluid was retrieved from operated joints, and a second analysis was performed. Physical and cellular analyses were conducted immediately after sample collection and the supernatant was stored at -80° C for further evaluations. These consisted in catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, total antioxidant capacity, vitamin E, protein carbonyl groups, chondroitin sulphate, hyaluronic acid, prostaglandin E₂, total protein and urea determinations. Osteoarthritic joints revealed greater activation of antioxidant defense systems, enzymatic and non-enzymatic, with greater activity of catalase, and greater concentrations of vitamin E,

respectively, when compared to osteochondritic joints. Additionally, these joints had higher total nucleated cell counts and prostaglandin E₂ and total protein concentrations, revealing a more inflammatory profile when compared to that of osteochondritic joints. Nonetheless, in osteochondritic joints synovial fluid and matrix components degradation was more pronounced, as there were higher concentrations of chondroitin sulphate and hyaluronic acid in synovial fluid obtained from these joints. Results also showed the occurrence of oxidative stress, 48 hours after the arthroscopic procedure, through higher catalase activity in synovial fluid, reflecting activation of antioxidant defenses. Treatment with autologous processed plasma increased vitamin E concentrations, incrementing non-enzymatic antioxidant defenses. No effects were observed on metabolic or inflammatory biomarkers. It was possible to infer that autologous processed plasma has the therapeutic potential to lessen oxidative stress effects on articular components in the postoperative period.

Key words: Equine. Synovial fluid. Haemoderivate. Oxidative stress. Autologous processed plasma.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose de GAGs do líquido sinovial de articulações dos grupos controle de OA e OC (COA e COC) e de articulações com OA e OC tratadas com PPA (POA e POC) às 0 e 48 horas. CS: condroitim sulfato; AH: ácido hialurônico; P1: AH padrão, 5µg; P2: CS padrão, 5 µg – São Paulo – 2010/2013 165
- Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose de GAGs do líquido sinovial de articulações do grupo de articulações com OC tratadas com PPA controle de (POC) às 0 e 48 horas. CS: condroitim sulfato; AH: ácido hialurônico; P1: AH padrão, 10µg; P2: CS padrão, 5 µg – São Paulo – 2010/2013 165

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1 – Atividade média e erro padrão da Catalase (nmol/min/mL) no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013 153
- Gráfico 2 – Atividade média e erro padrão da Catalase (nmol/min/mL) no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013 153
- Gráfico 3 - Atividade média e erro padrão da Catalase (nmol/min/mL) no líquido sinovial coletado das articulações acometidas por OA e OCD às 0 horas – São Paulo – 2013 154
- Gráfico 4– Concentração média e erro padrão de SOD/Ureia (U/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013 155
- Gráfico 5 – Concentração média e erro padrão da SOD/Ureia (U/mg) no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013 155
- Gráfico 6 – Atividade média e erro padrão de Glutathione Peroxidase (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013..... 156
- Gráfico 7 – Atividade média e erro padrão de Glutathione Peroxidase (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013 156
- Gráfico 8– Concentração média e erro padrão de TAC/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013 157
- Gráfico 9 – Concentração média e erro padrão de TAC/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupo osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo condicionado (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 201..... 157
- Gráfico 10 - Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013..... 158

Gráfico 11 – Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	158
Gráfico 12 – Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/ng) no líquido sinovial coletado das articulações acometidas por OA e OCD às 0 horas – São Paulo – 2013.....	159
Gráfico 13 – Concentração média e erro padrão de Proteína Carbonil/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013...	159
Gráfico 14 – Concentração média e erro padrão de Proteína Carbonil/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	160
Gráfico 15 – Viscosidade do líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	161
Gráfico 16 – Viscosidade do líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	161
Gráfico 17 – Qualidade do precipitado de mucina do líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013	162
Gráfico 18 – Qualidade do precipitado de mucina do líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	162
Gráfico 19 – Contagem de células totais no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) e tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	163
Gráfico 20 – Contagem de células totais no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) e tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	163
Gráfico 21 – Contagem de células totais no líquido sinovial coletado das articulações do acometidas por OA e OCD às 0 horas – São Paulo – 2013.....	164

Gráfico 22 –	Concentração média e erro padrão de CS/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo condicionado (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013	166
Gráfico 23 –	Concentração média e erro padrão de CS/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo condicionado (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	166
Gráfico 24 –	Concentração média e erro padrão de AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo condicionado (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013	167
Gráfico 25 –	Concentração média e erro padrão de AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	167
Gráfico 26 –	Concentração média e erro padrão de CS($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) e AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações com osteocondrite dissecante (OCD) e osteoartrite (OA) às 0 horas – São Paulo – 2013	168
Gráfico 27 –	Concentração média e erro padrão de PGE_2 /Ureia (pg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	169
Gráfico 28 –	Concentração média e erro padrão de PGE_2 /Ureia (pg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	169
Gráfico 29 –	Concentração média e erro padrão de PGE_2 (pg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações com osteocondrite dissecante (OCD) e osteoartrite (OA) às 0 horas – São Paulo – 2013.....	170
Gráfico 30 –	Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	170
Gráfico 31 –	Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) e tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	171

Gráfico 32 – Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações com osteocondrite dissecante (OCD) e osteoartrite (OA) às 0 horas – São Paulo – 2013	171
Gráfico 33 – Concentração média e erro padrão de Ureia (mg/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) e tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	172
Gráfico 34 – Concentração média e erro padrão de Ureia (mg/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) e tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013.....	172
Quadro 1 – Animais dos grupos controle e tratamento da OA e da OC – São Paulo – 2010/2013.....	137
Quadro 2 – Protocolo de centrifugação do PPA com variação de força centrífuga relativa (G) e variação do tempo em minutos (min.) – São Paulo- 2013	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	ácido hialurônico
ADAMTS	uma disintegrina e metaloproteinase com motivos trombospondina (A Disintegrin and Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs)
BH	Brasileiro de Hipismo
CAT	catalase
Cetavlon	brometo de cetiltrimetilamônio
CS	condroitim sulfato
CEHC	2,7,8 – trimethyl – 2 (β -carboxyethyl)-6- hydroxychroman
Da	Daltons
DAMPS	Padrões Moleculares Associados ao Dano (<i>Danger Associated Molecular Patterns</i>)
DMB	azul de 1,9-dimetilmetileno
DOD	doença ortopédica do desenvolvimento
EROs	espécies reativas do oxigênio
G	gravidades
g/dL	grama por decilitro
g/L	grama por litro
GAG	glicosaminoglicano
GPx	glutathione peroxidase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HAN	Hanoveriano
HAS	hialuronam sintase (<i>Hyaluronic Acid Synthase</i>)
HLPC	cromatografia líquida de alta performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IV	intravenoso
kg	quilograma
kDa	quiloDaltons
M	molar
MEC	matriz extracelular
mg	miligrama

mg/kg	miligrama por quilograma
mg/L	miligrama por litro
mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
MMP	metaloproteinase
ng	nanograma
ng/mg	nanograma por miligrama
ng/ml	nanograma por mililitro
nm	nanômetro
nmol/mg	nanomol por miligrama
nmol/min/ml	nanomol por minuto por mililitro
NO	óxido nítrico
O ₂ ⁻	radical superóxido
OA	osteoartrite
OC	osteocondrose
OCD	osteocondrite dissecante
OH ⁻	radical hidroxila
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>)
PDA	1,3-diaminopropano-acetato
PG	proteoglicano
pg/mg	picograma por miligrama
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PSL	Puro Sangue Lusitano
QM	Quarto de Milha
SOD	superóxido dismutase
TBS	salina tamponada com Tris (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TLR	Toll-Like Receptor
Tris-HCl	tampão Tris (hidroximetil)- aminometano – ácido clorídrico
U/μg	unidade por micrograma
μg	micrograma
μg/ml	micrograma por mililitro
μl	microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	A OSTEOARTRITE	29
2.1.1	Moléculas inflamatórias na AO.....	31
2.1.2	Moléculas anti-inflamatórias na AO.....	37
2.1.3	A cartilagem articular	40
2.1.4	A membrana sinovial	46
2.1.5	O osso subcondral.....	49
2.1.6	A OA e o equino jovem	53
2.2	A OSTEOCONDROSE.....	56
2.2.1	Apresentação.....	56
2.2.2	As lesões osteocondrais juvenis	58
2.2.3	A cartilagem de crescimento sadia.....	60
2.2.4	A cartilagem de crescimento na OC	62
2.2.5	A patogenia da OC	64
2.2.6	O processo de ossificação endocondral.....	65
2.2.7	A OC como enfermidade multifatorial	69
2.3	O ESTRESSE OXIDATIVO.....	73
2.3.1	Os radicais livres.....	73
2.3.2	As Espécies Reativas do oxigênio (EROs)	76
2.3.3	A síntese das EROs	77
2.3.4	A NADPH oxidase	78
2.3.5	O Radical Superóxido (O_2^-)	79
2.3.6	Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	80
2.3.7	O Radical Hidroxila ($OH^\cdot$)	81
2.3.8	Defesas Antioxidantes	83
2.3.9	Proteção enzimática contra as EROs.....	83
2.3.9.1	A Superóxido Dismutase (SOD).....	83
2.3.9.2	A catalase.....	85
2.3.9.3	A Glutathione Peroxidase (GPx).....	85
2.3.10	Proteção não enzimática contra as EROs	86

2.3.10.1 A vitamina C.....	87
2.3.10.2 A Glutathiona (GSH).....	87
2.3.10.3 A Metalotioneína	88
2.3.10.4 A Vitamina E.....	89
2.3.10.5 Os carotenoides	90
2.3.11 O estresse oxidativo- definição	90
2.3.12 O papel das EROs nos processos biológicos.....	93
2.3.13 O dano oxidativo aos cromossomos	98
2.3.14 O dano oxidativo aos lipídeos	99
2.3.15 dano oxidativo às proteínas.....	100
2.3.16 O dano oxidativo à mitocôndria.....	101
2.3.17 Métodos para avaliação do estresse oxidativo	103
2.4 O ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE OS COMPONENTES ARTICULARES	105
2.4.1 As EROs nas vias de sinalização do condrócito.....	110
2.4.2 As EROs e a senescência e morte do condrócito	112
2.4.3 As EROs e o dano mitocondrial no condrócito.....	114
2.4.4 As EROs e a degeneração da matriz extracelular da cartilagem	116
2.4.5 As EROs e a degradação do Ácido Hialurônico	118
2.4.6 As EROs e o processo de ossificação endocondral	120
2.4.7 As EROs e o remodelamento ósseo	121
2.4.8 O estresse oxidativo e o Líquido Sinovial.....	122
2.5.9 Sistemas de defesa antioxidante da cartilagem.....	124
2.5 O LÍQUIDO SINOVAL	125
2.6 O PLASMA PROCESSADO AUTÓLOGO.....	130
3 JUSTIFICATIVA.....	134
4 OBJETIVO	135
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	136
5.1 ANIMAIS.....	136
5.2 OBTENÇÃO DO PPA	139
5.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E ARTROSCÓPICO	139
5.4 COLETA DE MATERIAL	141
5.4.1 Líquido Sinovial.....	141
5.5 ANÁLISE DO MATERIAL	141
5.5.1 Avaliação do estado redox do líquido sinovial	141

5.5.1.1 Determinação da atividade da enzima Catalase	141
5.5.1.2 Determinação da enzima Superóxido Dismutase	142
5.5.1.3 Determinação da atividade da enzima Glutathione Peroxidase.....	143
5.5.1.4 Determinação da Capacidade Antioxidante Total	144
5.5.1.5 Determinação da Vitamina E.....	145
5.5.1.6 Determinação dos grupos proteína carbonil	146
5.5.2 Análise Física e Celular do líquido sinovial	147
5.5.2.1 Viscosidade.....	147
5.5.2.2 Teste do Precipitado de Mucina	148
5.5.2.3 Contagem total de células.....	148
5.5.3 Determinação dos Glicosaminoglicanos	148
5.5.4 Biomarcadores Inflamatórios	149
5.5.4.1 Determinação da PGE ₂	149
5.5.4.2 Determinação da Proteína Total	150
5.5.5 Determinação da Ureia	150
5.5.6 Análise Estatística	150
6 RESULTADOS	152
6.1 ANIMAIS	152
6.2 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL.....	152
6.2.1 Avaliação do estado redox	153
6.2.1.1 A atividade da Catalase	153
6.2.1.2 A Superóxido Dismutase	154
6.2.1.3 A atividade da Glutathione Peroxidase	155
6.2.1.4 A Capacidade Antioxidante Total	156
6.2.1.5 A Vitamina E.....	157
6.2.1.6 Os grupos proteína carbonil.....	159
6.2.2 Análise física e celular do líquido sinovial.....	160
6.2.2.1 Viscosidade.....	160
6.2.2.2 Teste do Precipitado de Mucina	162
6.2.2.3 Contagem total de células nucleadas	163
6.2.3 Identificação e quantificação de glicosaminoglicanos	164
6.2.3.1 Quantificação do Condroitim Sulfato.....	166
6.2.3.2 Quantificação do Ácido Hialurônico	167
6.2.4 Biomarcadores Inflamatórios	168

6.2.4.1 Determinação da PGE ₂	168
6.2.4.2 Determinação da Proteína Total	170
6.2.5 Determinação da Ureia	171
7 DISCUSSÃO	173
8 CONCLUSÕES.....	197
REFERÊNCIAS	198
APÊNDICES	247

1 INTRODUÇÃO

Cavalo e movimento são indissociáveis. O cavalo pode ser definido, em sua utilidade e estética, pelo movimento. A capacidade de movimento introduziu o cavalo nas civilizações antigas como instrumento para o trabalho, a guerra e o lazer e promoveu a socialização de povos, à medida que conferiu a estes maior mobilidade e capacidade de conquistar novos territórios.

No último século, com a industrialização e a modernização dos meios de produção e locomoção, o cavalo deixou de desempenhar papéis primordiais enquanto instrumento de trabalho e defesa, permanecendo ligado ao homem essencialmente pela capacidade de movimento, quer seja em atividades de lazer ou em competições atléticas (VAN WEEREN, 2001). Com a grande popularização dos esportes equestres e a elevação do nível das competições, aumentaram consideravelmente as demandas atléticas impostas aos equinos. Elas impulsionaram o aprimoramento dos programas de treinamento e o aprofundamento dos conhecimentos de anatomia e fisiologia, imprescindíveis para a abordagem do equino como atleta (VAN WEEREN, 2001).

Um programa adequado de treinamento é essencial para alcançar a máxima capacidade atlética. Ele viabiliza a integração de várias características anatômicas e fisiológicas, que possibilitarão o desempenho esportivo com eficiência e segurança, induzindo no organismo as adaptações fisiológicas necessárias para este fim. Um programa de treinamento adequado minimiza os riscos de injúrias e fornece ferramentas comportamentais e psicológicas favoráveis ao êxito nas competições. Estas adaptações advêm de exercícios repetitivos que modulam funções, processos fisiológicos, estruturas anatômicas e padrões comportamentais, reduzindo o impacto de fatores de estresse associados ao exercício. Resumidamente, os exercícios repetidos induzem à quebra de homeostase em diversos sistemas e tecidos, e esta ruptura incitará uma resposta do organismo, com o intuito de aumentar sua capacidade para lidar com a sobrecarga de trabalho imposta. É importante que esta sobrecarga (traduzida por aumento em intensidade, número de repetições, duração do exercício ou maior regularidade na prática de atividades físicas) introduza novas demandas no organismo, sem as quais não haverá efeito de condicionamento. No entanto, é igualmente importante dosar a intensidade da sobrecarga, com o objetivo de evitar o risco de lesões ortopédicas e alterações do perfil psicológico do animal (HINCHCLIFF; GEOR, 2004).

O impacto das exigências físicas sobre o equino em treinamento depende de vários fatores, que incluem a condição física do animal, a aptidão e a vulnerabilidade individual, o programa de treinamento aplicado e a pré-existência de injúrias (ENGEVALL, 2013). Estresses biomecânicos, resultantes de exercícios de intensidade, duração e frequência inadequados resultam, frequentemente, em lesões do sistema musculoesquelético, e em particular dos tecidos componentes das articulações, quer sejam eles cartilaginosos, ósseos, sinoviais ou fibrosos. (POOL, 1996; RIGGS, 2006). Eles causam injúrias na medida em que excedem os limites fisiológicos, sobrepunhando a capacidade de remodelamento dos tecidos, em resposta aos desafios impostos. No caso de lesões pré-existent, mesmo exigências mecânicas consideradas aceitáveis podem causar sintomatologia, evidenciando a falência prévia dos processos de reparação destes tecidos (RIGGS, 2006; EGENVALL et al., 2008). Uma vez instaladas, as lesões ortopédicas levam à interrupção temporária ou permanente da atividade física e ao prejuízo da capacidade atlética. (DISON, 2001; PENELL et al., 2005; REED et al., 2012; EGENVALL et al., 2013).

A importância das injúrias ortopédicas na espécie equina não pode ser suficientemente enfatizada (EGENVALL et al., 2008; VAN WEEREN; DENOIX, 2013). Dados epidemiológicos coletados de mais de 100.000 cavalos revelam que as lesões articulares são responsáveis pela maior parte das afecções que os acometem, e são o principal motivo para a solicitação de cuidados médico-veterinários (PENELL et al., 2005). Dentre as enfermidades articulares, nos equinos, destacam-se pela importância e pelo desafio que representam na clínica ortopédica, a osteoartrite (OA) e a osteocondrose (OC) (CRUZ; HURTIG, 2008; CHIARADIA et al., 2012).

Juntas, a OA e a OC constituem a principal causa de perda econômica na indústria equina (FRISBIE, 2006). Elas diferem em relação a etiopatogenia, a patologia da articulação sinovial, a apresentação clínica e aos desafios diagnósticos que impõem, mas uma vez que encontram-se sediadas sobre o mesmo complexo cartilagem-osso subcondral, comprometem de maneira similar a performance e causam grandes prejuízos à indústria equina (JEFFCOTT 1996; ROBERT et al., 2013). Também de maneira similar, afetam vias comuns que regulam a homeostase articular (DE GRAUW, 2011a; CHIARADIA et al., 2012) e induzem a claudicações que podem limitar ou encerrar a carreira atlética dos equinos (JEFFCOTT, 1991; SUTTON et al., 2009; FERRIS et al., 2011).

No contexto do crescente interesse em relação a estas afecções, multiplicaram-se os estudos empregando análises do líquido sinovial. O destaque deve-se tanto ao papel

primordial que o líquido sinovial desempenha no funcionamento e na homeostase articular (TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1994), como também ao fato de ser ele rico substrato para a pesquisa de eventos metabólicos, inflamatórios e de sinalização nos tecidos articulares. Tais estudos auxiliam na compreensão dos mecanismos de agressão e de defesa envolvidos na instalação e progressão das enfermidades articulares, e apontam diretrizes para alternativas terapêuticas, visando o abrandamento do curso e da sintomatologia relacionados às mesmas.

Os hemoderivados surgem neste cenário, impulsionados pela parcial falha de sucesso das terapias existentes para o manejo clínico das artropatias, pela necessidade de substituí-las ou associá-las a novos protocolos de tratamento e pela urgência de retorno aos treinamentos nos atletas. Os hemoderivados autólogos, ainda, gozam de adicional popularidade por serem supostamente inócuos e acessíveis (MAJEWSKI et al., 2009; BALTZER et al., 2009; MIDDLETON et al., 2012; CERCIELLO et al., 2013).

Baseado em estudo anterior que demonstrou *in vitro* a propriedade antioxidante do PPA sobre células estimuladas do líquido sinovial equino (BROSSI; BACCARIN; MASSOCO, 2012), o presente estudo teve como objetivo principal observar os efeitos deste hemoderivado *in vivo*. Ele foi utilizado ao término de artroscopias, realizadas para o tratamento de OA ou OCD e seus efeitos foram observados através da análise de líquido sinovial. O líquido sinovial foi coletado imediatamente antes e 48 horas após a artroscopia para análise dos sistemas antioxidantes, de marcadores de estresse oxidativo, análise física, celular, e molecular.

O papel do estresse oxidativo em várias enfermidades equinas tem recebido crescente destaque (SOFFLER, 2007; KIRSCHVINK; MOFFARTS; LEKEUX, 2008). A participação dos radicais livres no processo inflamatório articular é substanciada por um número crescente de estudos na espécie humana (LAURINDO et al., 1997; CLEGG; MOBASHERI, 2003; HENROTIN; BRUCKNER; PUJOL, 2003) e por um número ainda não suficientemente grande na espécie equina (AUER; NG; SEAWRIGHT, 1990; AUER; NG; SEAWRIGHT, 1993; DIMOCK; SICILIANO; MCILWRAITH, 2000; DAIX et al., 2007; VILLASANTE et al., 2010). Contudo é importante reconhecer que a implicação dos radicais livres na patogenia das enfermidades articulares oferece a possibilidade de novas abordagens terapêuticas (LAURINDO et al., 1997). O presente trabalho procurará verificar e determinar as propriedades antioxidantes do plasma processado autólogo para justificar seu emprego no tratamento das enfermidades articulares dos equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é uma das causas mais comuns de claudicação em equinos. Está frequentemente associada ao prejuízo do desempenho físico, ao precoce encerramento da carreira atlética de participantes de várias modalidades esportivas equestres e a significativos encargos financeiros para proprietários dos animais afetados (CARON, 2003; CRUZ; HURTIG, 2008; SUTTON et al., 2009).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da OA são numerosos e podem ser de natureza mecânica ou bioquímica. Eles incidem sobre as articulações através de dois mecanismos fundamentais; o primeiro está relacionado aos efeitos adversos de cargas anormais sobre a cartilagem articular normal e o segundo diz respeito aos efeitos de cargas normais sobre a cartilagem articular anormal. Insultos mecânicos, tais como aqueles advindos do sobrepeso, da atividade física, do mau alinhamento das superfícies articulares, de traumas articulares e cirurgia, são exemplos do primeiro caso. Anormalidades bioquímicas, determinadas por doenças genéticas ou metabólicas, exemplificam o segundo. Aliados ou isoladamente, fatores mecânicos e bioquímicos contribuem para o desencadeamento e a progressão da OA (SAMUELS; KRASNOKUTSKY; ABRAMSON, 2008; GOLDRING; GOLDRING, 2010; BUCKWALTER et al., 2013).

Recentes avanços incrementaram não só o conhecimento dos agentes envolvidos na instalação da OA, mas também o dos mecanismos responsáveis por sua progressão. Mais do que uma afecção singular, a OA representa, atualmente, o estágio final da falência articular, iniciado e perpetuado pelos múltiplos fatores causais. De acordo com esta concepção, algumas formas de OA podem ser caracterizadas como inflamatórias, genéticas ou bioquímicas, mas todas convergem para um fenótipo comum (KAPOOR et al., 2011). Ainda em face destes progressos, as pesquisas em relação à OA tomaram um novo rumo, e ampliaram os conhecimentos relacionados à etiopatogenia da enfermidade, abordando não apenas a destruição da cartilagem articular, mas alterações da articulação como um todo (SAMUELS; KRASNOKUTSKY; ABRAMSON, 2008).

Conforme enunciado historicamente na literatura especializada, a OA resultante de estresses mecânicos era considerada essencialmente como uma afecção primária da

cartilagem articular. A OA era caracterizada por degeneração progressiva e crônica desta cartilagem, redução do espaço articular e remodelamento de margens ósseas, com formação de osteófitos periarticulares (POOL, 1997). Nos últimos anos, exames de imagem mais sofisticados, tais como a ressonância magnética e ultrassonografia, confirmaram o envolvimento da cartilagem articular mas, mais notoriamente, puderam detectar alterações morfológicas no osso subcondral, na medula óssea e na membrana sinovial, corroborando para noção emergente de que a OA é uma enfermidade de múltiplos compartimentos (SAMUELS; KRASNOKUTSKY; ABRAMSON, 2008). Desta forma, apesar da importância da degradação da cartilagem, o envolvimento de todas as estruturas articulares passou a ser considerado fundamental para a compreensão da patofisiologia da OA (BRANDT et al., 2006; SAMUELS; KRASNOKUTSKY; ABRAMSON, 2008; GOLDRING; GOLDRING, 2010). A sequência exata dos eventos adversos implicados na instalação da enfermidade, contudo, ainda não foi determinada; a relação temporal entre dano à ossatura subcondral, inflamação crônica do tecido sinovial e erosão da cartilagem articular permanece por ser desvendada (KAPOOR et al., 2011).

Não só a existência de um único evento central na patogenia da OA tem sido alvo de questionamentos, mas também sua natureza tem sido investigada mais detidamente. Avanços na área de biologia molecular na década de 1990 modificaram profundamente o paradigma que concentrava a caracterização da OA em eventos degenerativos, de natureza progressiva, sediados na cartilagem articular (BERENBAUM, 2013). A osteoartrite foi considerada por muito tempo como uma artropatia tipicamente não inflamatória, pela ausência de neutrófilos no líquido sinovial e pela ausência de manifestações sistêmicas nos indivíduos acometidos (GOLDRING; OTERO, 2011). Contudo, a descoberta de que vários mediadores solúveis tais como citocinas e prostaglandinas, sintetizados pelos condrócitos, células sinoviais e células do sistema imune poderiam aumentar a produção de metaloproteinases degradadoras de matriz (MMPs), levou aos primeiros passos para a elaboração de uma “teoria inflamatória” para o desencadeamento da OA. Apesar de certa resistência inicial, estudos recentes têm fornecido evidências de que a sinovite pode ser o evento condutor no processo de estabelecimento da OA. Inicialmente considerada como uma enfermidade fundamentalmente degenerativa da cartilagem articular, a OA apresenta uma natureza muito mais complexa, com mediadores inflamatórios provenientes de todos os tecidos articulares exercendo papel fundamental em sua iniciação e perpetuação (LOESER, 2008; BERENBAUM, 2013; SOKOLOVE; LEPUS, 2013).

2.1.1 Moléculas inflamatórias na OA

As duas principais citocinas inflamatórias envolvidas na patogenia da OA são a interleucina-1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Elas são produzidas pelos sinoviócitos ativados, pelas células mononucleares e pelos condrócitos da cartilagem articular (SELLAM; BERENBAUM, 2010). A sinalização por estas citocinas culmina com a ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), que induz produção autócrina de IL-1 β e TNF- α , e também a expressão de outros mediadores inflamatórios e de degradação da MEC, incluindo a prostaglandina E₂ (PGE₂), a interleucina-6 (IL-6) e as MMPs (SOKOLOVE; LEPUS, 2013).

Além da ativação de enzimas proteolíticas, a sinalização pela IL-1 β suprime a síntese de agregam e colágeno pelos condrócitos. O agregam é o principal proteoglicano constituinte da matriz extracelular (MEC) da cartilagem articular e, juntamente com o colágeno do tipo II, confere a cartilagem as propriedades de resistência e absorção de choque, que a tornam um componente fundamental para o perfeito funcionamento da articulação (TORTORELLA et al., 1999; GOLDRING et al., 1988; RICHARDSON; DODGE, 2000). Da mesma forma que nos humanos, a IL-1 está presente no líquido sinovial de equinos acometidos por OA (MORRIS et al., 1990), mas alguns autores encontraram aumentos não significativos na membrana sinovial, enquanto a cartilagem articular apresentou níveis elevados de expressão de IL-1 β (KAMM; NIXON; WITTE, 2010). Adicionalmente, o catabolismo da MEC é fomentado pela inibição da síntese de inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs), induzida pela IL-1 β (CARON, 2003).

À semelhança do que ocorre com a IL-1, o TNF- α pode ativar a produção de proteases pelos condrócitos e suprimir a síntese de moléculas integrantes da MEC, como proteoglicanos e colágeno. Seu papel na OA equina, contudo, ainda é controverso; enquanto alguns autores concentram sobre a IL-1 β a responsabilidade pelos eventos deletérios observados durante a evolução da enfermidade, outros demonstram o papel sobrepujante do TNF- α nestes eventos (BILLINGHURST; FRETZ; GORDON, 1995; JOUGLIN et al., 2000; LEY et al., 2007; KAMM; NIXON; WITTE, 2010). O TNF- α também produz uma resposta de estresse oxidativo, ativando os fatores de transcrição, tais como o NF- κ B. Eles controlam a expressão de mediadores de crescimento celular e eventos relacionados à indução de apoptose (SUZUKI; FORMAN; SEVANIAN, 1997).

A sintonia entre IL-1 β e TNF- α , juntamente com a participação de outras citocinas como a IL-6 e a interleucina 17 (IL-17), é muito importante na progressão da OA. Em resposta a estas citocinas catabólicas, além da redução da síntese dos componentes de matriz, os condrócitos passam a produzir mais PGE₂ e proteína morfogenética -2 (BMP-2) e ambas aumentam, inicialmente, a expressão de colágeno tipo II (MUELLER; TUAN, 2011). Este efeito parece ser uma tentativa dos condrócitos de compensar a perda de substância da MEC. Posteriormente, contudo, a PGE₂ vai contribuir para o desenvolvimento das lesões na OA, causando inflamação sinovial, depleção da MEC e erosão da cartilagem e do osso (CARON, 2003). É um dos principais mediadores de inflamação e dor na OA. A produção de PGE₂ depende da ação de duas enzimas, a cicloxigenase-2 (COX-2) e a prostaglandina E sintetase, ambas induzíveis pela IL-1 β .

A IL-17 é outra citocina inflamatória presente na membrana sinovial, e induz à produção de fatores pró-angiogênicos, atuando sozinha ou em cooperação com o TNF- α . Ela contribui para a inflamação da cartilagem, estimulando condrócitos e fibroblastos sinoviais a liberar mais citocinas e quimocinas. As quimocinas são pequenas moléculas que favorecem o tráfico e o recrutamento de células inflamatórias, tais como a IL-8 e a proteína α de crescimento regulado (GRO- α), e estão envolvidas na atração de células mononucleares e na diferenciação dos condrócitos (SELLAM; BERENBAUM, 2010).

A interleucina-15 (IL-15) é uma citocina produzida nas respostas imunes inatas e apresenta-se em concentrações elevadas no líquido sinovial de pacientes portadores de OA, nos estágios iniciais da enfermidade. Está envolvida na biologia dos linfócitos, particularmente no achado de infiltrados perivasculares linfocitários na membrana sinovial de pacientes portadores de OA, na produção de MMPS e está associada à presença e à progressão de achados radiográficos. Receptores para a IL-15 estão presentes nas células de revestimento sinovial e no endotélio da membrana sinovial, assim como nos condrócitos (SCANZELLO et al., 2009; SCANZELLO; GOLDRING, 2012).

A interleucina-21 (IL-21), que possui uma cadeia gama em comum com a IL-15, também está presente em altas concentrações na membrana sinovial de pacientes nos estados iniciais da OA (SCANZELLO et al., 2009). Seu papel ainda não foi determinado na OA equina.

Outros fatores, em adição a estes mediadores solúveis, fomentam a cadeia de eventos inflamatórios associados à OA, corroborando para a necessidade de ampliar sua caracterização (HASEEB; HAQQI, 2013). O sistema imune inato é um destes fatores, e mostra-se precocemente ativado nas articulações de pacientes afetados; a presença de

receptores específicos na membrana sinovial e na cartilagem articular são evidências do envolvimento do sistema imune inato na patogenia da OA (SELLAM; BERENBAUM, 2010).

Resumidamente, o sistema imune inato desempenha um papel essencial na defesa do hospedeiro contra a invasão microbiana e na modulação de múltiplas formas de injúria e reparação tissular. Ele envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), pelos chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), dos quais o receptor do tipo toll-like (TLR) é um dos mais conhecidos (RU LIU-BRYAN, 2013). A ativação dos PRRs desencadeia a sinalização celular, que levará à produção de citocinas pró-inflamatórias e quimocinas e à indução de respostas inflamatórias (PICCININI; MIDWOOD, 2010). Nos pacientes portadores de OA foi demonstrado o aumento da expressão de TLRs na cartilagem lesionada e a presença de DAMPs ligantes para estes receptores, tais como ácido hialurônico (AH) de baixo peso molecular e a fibronectina, presentes no líquido sinovial. Estes ligantes podem induzir a respostas catabólicas nos condrócitos e/ou respostas inflamatórias nos sinoviócitos (KIM et al., 2006; SCANZELLO; PLAAS; CROW, 2008; GARCÍA-ARNANDIS et al., 2010; NAIR et al., 2012).

Outro grupo de proteínas relacionadas ao sistema imune inato que também demonstrou estar envolvido no contexto inflamatório da OA é o do complemento. A principal função do sistema do complemento é a de reconhecer partículas e macromoléculas estranhas, promovendo sua eliminação por opsonização ou lise. As proteínas do complemento, depois de ativadas, resultam na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (CAROLL; SIM, 2011). A expressão e ativação de proteínas do sistema do complemento são anormalmente altas em articulações humanas acometidas por OA, no líquido articular e na membrana sinovial (KONTTINEN et al., 1996; WANG et al., 2011; RU LIU-BRYAN, 2013). Na OA, componentes da MEC, tais como a proteína oligomérica da matriz cartilágnea (COMP) e a fibromodulina, que se encontram em altas concentrações no líquido sinovial, são capazes de ativar a cascata do complemento (SJÖBERG et al., 2005; HAPPONEN et al., 2010). É interessante notar que o agregam, mas não o colágeno tipo II, é capaz de ativar o complemento, apesar dos dois serem constituintes fundamentais da MEC (WANG et al., 2011).

Outro fator implicado na deflagração e no agravamento da OA é a presença de um estado inflamatório sistêmico sutil, como é o caso dos indivíduos com síndrome metabólica ou naqueles de idade avançada. Neles, a liberação de mediadores inflamatórios para a corrente sanguínea exerce efeitos deletérios, que podem atuar sobre as articulações iniciando e/ou

perpetuando a OA. Sob a ação destes mediadores, as células de articulações acometidas por OA são ativadas, liberando mais mediadores inflamatórios na cavidade articular e, eventualmente, no sangue. Os mediadores presentes no líquido sinovial amplificam o estado inflamatório sistêmico sutil, induzindo ou acelerando o desenvolvimento de outras enfermidades crônicas, susceptíveis aos efeitos do estado inflamatório sistêmico (BERENBAUM, 2013; KATZ; VELASQUEZ, 2013; SCOTECCE et al., 2013; SOKOLOVE; LEPUS, 2013).

Ainda, alguns fatores de crescimento estão paradoxalmente implicados na patogenia da OA, como o fator de crescimento de transformação- β 1 (TGF- β 1) e o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1).

O TGF- β representa uma família de proteínas envolvidas em múltiplas atividades de sinalização biológica, incluindo a diferenciação e a proliferação celular. O TGF- β desempenha um papel fundamental nos processos anabólicos da cartilagem articular, atuando em vários níveis e neutralizando os efeitos das citocinas catabólicas, particularmente os da IL-1 e do TNF- α sobre a síntese de colágeno e proteoglicanos. O TGF- β estimula a síntese destes componentes de matriz, de inibidores de proteases e diminui a expressão de receptores de citocinas e enzimas degradadoras. Por favorecer a síntese de MEC, constitui-se em uma potencial intervenção terapêutica para amenizar a destruição de cartilagem que ocorre na OA. A falta de TGF-1 β , ou anormalidades em sua sinalização, resultam em susceptibilidade ao dano à matriz cartilaginosa, em depleção de proteoglicanos e colágeno e em redução da espessura da cartilagem articular.

Curiosamente, em contraste com a expressão insuficiente de TGF- β observada na cartilagem, ele está presente em abundância na membrana sinovial, na OA progressiva. Desta forma o TGF- β pode estar envolvido na hiperplasia da membrana sinovial, típica da OA. Além de ser um potente indutor de fibrose sinovial, o TGF- β também é capaz de induzir à formação de osteófitos, uma ocorrência bastante frequente e característica da OA. A expressão e sinalização ativa de TGF- β são encontradas de maneira contundente em osteófitos de articulações afetadas pela OA, comprovando sua presença em articulações afetadas, mas não no local onde é mais necessário, a cartilagem articular (HULTH et al., 1996; BLANEY DAVIDSON; VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2007)

O IGF-1 é outro fator de crescimento com efeitos ambíguos sobre a cartilagem e sua produção é estimulada pela IL-1 β . Ele exerce efeitos anabólicos ao aumentar a proliferação celular e promover a síntese de proteoglicanos e colágeno tipo II, favorecendo a síntese de MEC e protegendo a cartilagem dos processos de degradação (MAOR; HOCHBERG;

SIBERMANN, 1993; HAUPT et al., 2005). Adicionalmente, o IGF-1 não possui ações unicamente anabólicas, podendo também favorecer eventos anti-catabólicos como, por exemplo, a diminuição da transcrição da MMP-13 induzida pela IL-1 β (IM et al., 2003). Contudo, o IGF-1 pode exercer efeitos negativos, que contribuem para a progressão da OA, como o incentivo à formação de osteófitos (OKAZAKI et al., 1999), onde é encontrado em maiores concentrações (VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2007). Estas observações contribuem para a natureza conflitante das ações do IGF-1, na medida em que ele parece ser responsável, assim como o TGF- β , por eventos, hora favoráveis e hora adversos, na progressão da OA.

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são um grupo de proteínas envolvidas na regulação de vários processos de desenvolvimento e da fisiologia celular, sendo uma de suas principais funções a de manutenção da homeostase da cartilagem articular. As BMP-2, BMP-4 e BMP-7 são as mais estudadas e estão envolvidas com o aumento da expressão de genes relacionados à síntese de componentes da MEC. Elas também têm um papel importante na diferenciação terminal dos condrócitos, na cartilagem de crescimento. Nos estágios finais deste processo de diferenciação, levam a produção de MMP-13, que estimulará a degradação da MEC, para o remodelamento da cartilagem. Recentemente o papel das BMPs na OA foi revisado. Citocinas inflamatórias, como a IL-1 β e o TNF- α , ativam as BMPs nos condrócitos e estas estimulam a síntese do colágeno tipo II na cartilagem articular afetada (MUELLER; TUAN, 2011). A produção de MMPs a que induzem, contudo, é desfavorável para a matriz, onde os processos de síntese e degradação de seus componentes já se encontram desregulados. Estes achados somam às ações anabólicas das BMPs propriedades catabólicas, e ainda não está claro qual destas ações é dominante, ou em quais circunstâncias ou em que subgrupos de pacientes elas se manifestam (VAN DER KRAAN; BLANEY DAVIDSON; VAN DEN BERG, 2010).

Participam ainda da patogenia inflamatória da OA, as espécies reativas do oxigênio (EROs) (ZISKOVEN et al., 2011). As EROs estão envolvidas na degradação do AH (SAARI, 1991), em processos anti-anabólicos (YIN; PARK; LOESER, 2009) e catabólicos da cartilagem articular (ASADA et al., 1999; BEECHER et al., 2007; LI; XIE; WANG, 2012), na promoção da senescência (TOUSSAINT et al., 2000; TOUSSAINT; MEDRANO; VON ZGLINICKI, 2000; VON ZGLINICKI, 2002) e apoptose dos condrócitos (DEL CARLO; LOESER, 2003) e na depleção dos componentes de defesa antioxidante articulares (AIGNER et al., 2006).

Os efeitos do estresse oxidativo sobre as células da cartilagem articular, a membrana sinovial e o osso subcondral são determinantes na patogenia da OA (REGAN et al., 2005; AFONSO et al., 2007; WAUQUIER et al., 2009; ZISKOVEN et al., 2011). As EROs contribuem para o dano à MEC inibindo sua síntese e estimulando sua degradação, acelerando a progressão da enfermidade (TIKU; SHAH; ALLISON, 2000; LI; XIE; WANG, 2012). As EROs presentes na cartilagem afetada pela OA também desempenham papel importante na insensibilidade dos condrócitos às ações anabólicas do IGF-1, diminuindo as possibilidades de reparo estrutural (STUDER et al., 2000; YIN; PARK; LOESER, 2009).

Como evidências do envolvimento do dano oxidativo na patogenia da OA, genes importantes para as defesas antioxidantes foram encontrados na cartilagem articular, incluindo aqueles para as enzimas antioxidantes superóxido dismutase 2 e superóxido dismutase 3 (SOD2 e SOD3) e para glutathiona peroxidase (GPx) (AIGNER et al., 2006). Adicionalmente, Martin e Buckwalter (2006) demonstraram que sobrecargas mecânicas que excedem a tolerância das superfícies articulares levam ao dano dos condrócitos pelo estresse oxidativo.

A senescência prematura e a apoptose dos condrócitos, dois eventos importantes e característicos na cartilagem afetada pela OA, parecem resultar dos efeitos do óxido nítrico e da injúria oxidativa (BLANCO et al., 1998; LOESER, 2006; AFONSO et al., 2007; KIM; BLANCO, 2007; LOESER, 2009). O incremento das EROS também está associado ao envelhecimento, que na espécie humana é um dos fatores implicados na predisposição dos indivíduos idosos ao desenvolvimento da OA (LOESER, 2004; SHANE ANDERSON; LOESER, 2010). O aumento do estresse oxidativo que acompanha o envelhecimento representa um fator importante para o desenvolvimento da enfermidade, à medida que os condrócitos se tornam mais susceptíveis à morte celular mediada por agentes oxidantes, conseqüente à disfunção dos sistemas antioxidantes (DEL CARLO; LOESER, 2003; ALCARAZ et al., 2010).

As espécies reativas do nitrogênio, em particular o óxido nítrico (NO), também participam dos eventos patofisiológicos da OA. O NO é um radical livre altamente reativo, subproduto da oxidação da L-arginina à citrulina, produzido espontaneamente pela cartilagem afetada pela OA. É a expressão aumentada da enzima responsável pela sua síntese, a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) nos condrócitos da cartilagem comprometida, que resulta em excesso da produção de NO. A iNOS é induzida por fatores mecânicos, além de citocinas como a IL-1 β e o TNF- α .

O NO é um mediador inflamatório, catabólico, capaz de inibir a síntese de proteoglicanos e colágeno, além de participar da indução de MMPs pela IL-1 β . Além disto, é

um indutor de apoptose dos condrócitos e estimula a via de ativação do NF- κ B, que determina a transcrição de genes da IL-1 β , TNF- α , i NOS e MMPs, entre outros (MUELLER; TUAN, 2011). É também responsável pela redução da síntese da proteína antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra).

2.1.2 Moléculas anti-inflamatórias na OA

As citocinas anti-inflamatórias são moléculas imunorreguladoras, que controlam a resposta pró-inflamatória de outras citocinas. Elas agem em harmonia e conjuntamente com inibidores e receptores solúveis para regular as respostas imune e inflamatória. Seu papel na inflamação e nas enfermidades, de um modo geral, é cada vez mais reconhecido (OPAL; DEPALLO, 2000).

A membrana sinovial e a cartilagem articular também produzem, espontaneamente, citocinas anti-inflamatórias. São exemplos a interleucina-4 (IL-4), a interleucina-10 (IL-10), a interleucina-13 (IL-13) e a proteína antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). Todas se encontram presentes no líquido sinovial de pacientes humanos e equinos afetados pela OA (ALWAN et al., 1991; AREND et al., 1998; FERNANDES; MARTEL-PELLETIER; PELLETIER, 2002; CHOWDHURY; BADER; LEE, 2006; SUTTON et al., 2009; SELLAN; BERENBAUM, 2010). As citocinas anti-inflamatórias são capazes de inibir a degradação da cartilagem articular através de várias ações, mas basicamente elas se contrapõem à ação das citocinas pró-inflamatórias, de sorte que os efeitos resultantes da sinalização destas últimas deixam de ser observados. Assim, elas podem inibir a produção de MMPs, a produção de PGE₂ e de EROs, além de aumentar a produção de TIMPs (SUTTON et al., 2009).

IL-4 foi testada *in vitro* e suprimiu a produção de TNF- α e IL-1 β , à semelhança do que faz a IL-10 (FERNANDES; MARTEL-PELLETIER; PELLETIER, 2002). Ainda, a IL-4 inibiu a liberação de nitrito e a produção de PGE₂ induzidas pela IL-1 β em condrócitos de bovinos (CHOWDHURY; BADER; LEE, 2006).

A IL-10 é a citocina anti-inflamatória mais importante na resposta imune inata humana; é mensurável no sangue de pacientes portadores de afecções sistêmicas e de uma variedade de estados inflamatórios. Por esta razão, tem sido empregada terapeuticamente em estudos clínicos, que visam determinar com exatidão suas reais indicações e propriedades. A IL-10 foi detectada em culturas e biópsias de membranas sinoviais e no líquido sinovial de

pacientes acometidos por OA, e tanto o RNA mensageiro como a proteína IL-10 estão presentes na membrana sinovial (KATSIKIS et al., 1994; ZHANG; MAO; YU, 2004). As propriedades anti-inflamatórias da IL-10 incluem redução da produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, PGE₂ e MMPs e estímulo da produção de IL-1ra e TIMPs (ALAAEDDINE et al., 1999; LECHMAN et al., 1999). Ainda, a IL-10 exerce suas propriedades anti-inflamatórias inibindo a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) pelos neutrófilos polimorfonucleares. Esta inibição ocorre por meio do bloqueio da ativação da enzima NADPH oxidase, que inicia as reações de produção das EROS pelas células. O mecanismo envolve, especificamente, a inibição da fosforilação de um dos componentes da enzima, o que impossibilita sua ativação. Este parece ser o mecanismo de natureza antioxidante através do qual a IL-10 contribui para a regulação precisa da atividade da NADPH oxidase diminuindo, assim, o dano tecidual em locais de inflamação (HADDAD; FAHLMAN, 2002; DANG et al., 2006).

A IL-1ra é o terceiro ligante da família IL-1. É uma variante estrutural que se liga aos dois receptores para a IL-1, com avidéz semelhante à da IL-1 α e da IL-1 β , sem no entanto resultar em ativação das células. A IL-1ra é produzida em quatro diferentes isoformas, derivadas do mesmo gene. Vários mediadores naturais da inflamação, tais como a IL-1 β e a IL-6, assim como compostos sintéticos, ativam a transcrição da IL-1ra em condrócitos e macrófagos. Altas concentrações de IL-1ra foram encontradas no líquido sinovial de pacientes portadores de OA em comparação com os de indivíduos normais. A IL-1ra bloqueia os efeitos da IL-1, *in vitro*, inibindo a produção de PGE₂ e collagenase e revertendo a inibição da síntese de proteoglicanos na cartilagem articular (SECKINGER; KAUFMANN; DAYER, 1990; SECKINGER et al., 1990). Ainda, a utilização conjunta de vetores retrovirais carreadores de genes para expressão de IL-10 e IL-1ra no meio intra-articular apresentou efeitos condroprotetores (ZHANG; MAO; YU, 2004). Em equinos acometidos por OA, a utilização de IL-1ra mostrou efeitos benéficos sobre a evolução clínica e sobre aspectos histológicos da membrana sinovial (FRISBIE et al., 2007).

A existência de um antagonista natural para o receptor de IL-1 indica que o organismo monta uma resposta própria contra a inflamação. A síntese de IL-1ra é parte desta resposta, que tem como objetivo resolver o processo subjacente (DINARELLO; THOMPSON, 1991). A IL-1ra endógena pode ser muito importante na prevenção ou redução do dano local que resulta da produção excessiva de IL-1 (AREND; GABAY, 2000). Contudo, é o equilíbrio entre as concentrações de IL-1 e IL-1ra nos tecidos e no líquido sinovial que vai determinar os efeitos fisiológicos ou patofisiológicos da IL-1 (AREND, 2002). A produção de pequenas

quantidades de IL-1 e de grandes quantidades de IL-1ra parece ser uma resposta natural em situações clínicas. Isto acontece no líquido sinovial de pacientes portadores de artrite reumatoide, por exemplo, indicando que a IL-1ra contribui para limitar a severidade da doença, mas não em suficiente magnitude para debelar os sinais da infecção ou da inflamação (DINARELLO; THOMPSON, 1991; RICHETTE et al., 2008).

A compreensão de alguns aspectos da biologia da IL-1 e daquela de seu antagonista natural auxiliam na elucidação dos fatores que determinam o resultado de sua interação, e seu papel na osteoartrite. A inibição das ações biológicas da IL-1 requer a presença de quantidades de 100 a 1000 vezes maiores de IL-1ra, em relação às de IL-1 (AREND et al., 1990). Isto pode ser devido à alta sensibilidade das células-alvo a IL-1, que significa que a ligação de apenas algumas moléculas de IL-1 a seus receptores é suficiente para o desencadeamento de suas ações biológicas. Ainda, justificando o excesso de IL-1ra em relação a IL-1 está a presença do receptor do tipo II para a IL-1 na superfície das células, ou em sua forma solúvel no ambiente microcelular. Ele pode aumentar a competição pela IL-1ra disponível, uma vez que é biologicamente inativo e se liga com igual afinidade a ela (RUGGIERO et al., 1997). Em adição a isto, apenas 5% dos receptores precisam estar ligados a IL-1 para induzir a ativação celular, requerendo um excesso de proteína antagonista para bloquear a atividade desta citocina (EISENBERG et al., 1990). Mais ainda, com apenas 10 a 15% de ocupância, a IL-1 reduz a expressão dos receptores de superfície em 60 a 80%, por 24 a 72 horas, minimizando as possibilidades de ligação da IL-1ra e de antagonismo à suas ações (DINARELLO; THOMPSON, 1991). Também foi demonstrado que em condrócitos da cartilagem de pacientes acometidos por OA, o número de receptores para IL-1 é duas vezes maior do que o encontrado em condrócitos de cartilagem sadia, e que estes receptores em excesso exacerbam a resposta biológica da IL-1 (MARTEL-PELLETIER et al., 1992; RUGGIERO et al., 1997). Desta forma, apesar da concentração de IL-1ra exceder largamente em número a concentração de IL-1 na articulação acometida por OA, o desfecho dos eventos mediados pela interação destas moléculas anti-inflamatórias com os receptores nos tecidos articulares difere do numericamente esperado.

A IL-13 inibe a produção de TNF- α induzida por lipopolissacáride pelas células mononucleares, mas não exibe este efeito sobre células de líquido sinovial humano coletado de articulações inflamadas (FERNANDES; MARTEL-PELLETIER; PELLETIER, 2002).

A participação de todos os componentes articulares – cartilagem hialina, membrana sinovial e ossatura subcondral – na instalação e desenvolvimento da OA se dá através da ação e interação destas moléculas inflamatórias e anti-inflamatórias nos tecidos. Fatores liberados

pelo osso e pela membrana sinovial promovem a degradação da cartilagem articular, enquanto fatores liberados pela cartilagem induzem à sinovite e ao remodelamento ósseo. A existência de uma sequência cronológica, causal ou espacial para estes eventos ainda não foi demonstrada, mas é oportuno considerar todos os componentes articulares como agentes ativos e ao mesmo tempo passivos, no contexto das alterações estruturais e funcionais que definem a OA.

A OA deve, então, ser classificada de acordo com o sítio anatômico onde são observadas as primeiras alterações? Concentrar esforços terapêuticos em um só tecido será suficiente para retardar ou reverter danos ocorridos em tecidos adjacentes? (LOESER et al., 2012). A adoção de uma classificação anatômica para a osteoartrite tornou-se necessária, uma vez que evidências de anormalidades estruturais multifocais ocorrem desde o início da enfermidade. Em geral, pesquisadores e clínicos tendem a focar em uma estrutura específica na patogenia da doença articular, negligenciando outras, que podem ter participação igualmente importante. Apesar de a OA ser uma afecção heterogênea e multifatorial em origem, a ocorrência de sítios anatômicos específicos para sua instalação sugere a propriedade e a conveniência de uma nova classificação, relevante para seu estudo e para o desenvolvimento de estratégias de medicina regenerativa e preventiva (MCGONAGLE et al., 2010).

Examinaremos a seguir as manifestações da OA nestes sítios.

2.1.3 A cartilagem articular

A cartilagem articular hialina é o revestimento altamente especializado das superfícies ósseas que compõem uma articulação sinovial, com a importante função biomecânica de suportar cargas compressivas. Ela é composta por uma esparsa população celular, constituída exclusivamente por condrócitos, distribuída em uma extensa matriz extracelular, composta por colágenos e proteoglicanos. Os condrócitos sintetizam, organizam e regulam a deposição destes componentes da MEC. Fazem isto de maneira ordenada e eficiente, para que a taxas de síntese e degradação da matriz permitam os processos fundamentais de crescimento e remodelamento, garantindo o equilíbrio entre eles.

A organização, a estrutura e a integridade das macromoléculas constituintes da MEC vão determinar as propriedades físicas da cartilagem articular. O colágeno do tipo II, mas

também dos tipos IX e XI, forma uma rede fibrilar densa, que associada aos agregados de proteoglicanos e ácido hialurônico formam uma matriz densa e hidratada. Os proteoglicanos mantêm os espaços entre as fibras de colágeno e, assim, a hidratação tissular, bem como canais para a circulação de produtos hidrossolúveis. Os proteoglicanos, dentre os quais se destaca o agregam, são formados por um núcleo proteico, ao qual cadeias de glicosaminoglicanos polianiónicos estão ligadas. No caso particular do agregam, os glicosaminoglicanos (GAGs) que o constituem são o queratam sulfato e o condroitim sulfato (CS). Suas cadeias, com alta densidade de cargas negativas e ávidas por cátions, criam uma grande pressão de inchamento osmótico, trazendo água para a trama do tecido e expandindo a rede de colágeno. O equilíbrio entre a tensão da rede de colágeno e pressão osmótica das proteoglicanos confere as características biomecânicas da cartilagem articular. Várias moléculas de agregam encontram-se ligadas a uma mesma molécula de ácido hialurônico, formando grandes agregados (SCOTT, 1992; PLATT, 1996).

O hialuronam é outro GAG de fundamental importância para o arranjo da MEC. Ao contrário dos outros GAGs, ele não é sulfatado e é sintetizado na principalmente na membrana plasmática dos sinoviócitos. Ele também é sintetizado pelos condrócitos, mas em menor extensão, sendo liberado diretamente na matriz extracelular e permanecendo como uma capa sobre estas células (LAURENT; FRASER, 1992; BASTOW et al. 2003). É neste local pericelular que ocorrerá a formação dos agregados de proteoglicanos, dos quais o hialuronam participa, e que posteriormente serão deslocados para locais mais remotos da MEC, através de mecanismos ainda não completamente esclarecidos (ROUGHLEY, 2006). Da mesma forma que os outros GAGs, o hialuronam também apresenta-se carregado negativamente, contribuindo para a pressão de inchamento e para a hidratação da MEC (CRAIG et al., 1990).

Sob condições normais, a cartilagem hialina é um tecido braditrófico, com baixo índice de renovação de sua matriz extracelular. O condrócito, único elemento celular residente desta matriz, é quiescente e tem reduzida atividade metabólica. Não obstante, como visto, é responsável pela síntese de colágeno e de proteoglicanos, e pelos processos de remodelamento e reparação, que garantem a homeostase da cartilagem articular. Na cartilagem sadia, o agregam é o principal proteoglicano encontrado, possuindo uma meia-vida de 3 a 24 anos, enquanto a meia vida das fibras de colágeno do tipo II é de mais de 100 anos (MUELLER; TUAN, 2011). Danos à cartilagem revestem-se de maior importância ao considerarmos a baixa atividade metabólica dos condrócitos, que determina reduzida e lenta capacidade de reparação. Ao contrário dos outros tecidos, a cartilagem articular danificada não responde à

injúria através de uma resposta inflamatória usual, por não ser vascularizada e inervada (LOESER et al., 2012; BERENBAUM, 2013).

Quando ocorre a injúria, todos os tecidos articulares são afetados de maneira indistinta, mas a destruição da cartilagem articular é um dos eventos mais importantes e característicos para a instalação e o desenvolvimento da OA. Quando comprometido, o arranjo preciso de fibras de colágeno tipo II e proteoglicanos, responsável pelas funções de suporte e distribuição de cargas e pelo deslizamento das superfícies cartilagíneas, leva a alterações bioquímicas, estruturais, e biomecânicas de todos os tecidos articulares (CARON, 2003). Caso estas alterações não sejam revertidas, resultarão em deterioração das propriedades materiais e da integridade estrutural da cartilagem hialina, com progressiva destruição da articulação.

Os condrócitos procuram compensar a degradação da matriz, acelerando seu metabolismo, na tentativa de incrementar a síntese de proteínas constituintes da MEC, e aumentando sua taxa de proliferação celular, o que frequentemente resulta em aglomeramento destas células na cartilagem afetada (MURPHY; NAGASE, 2008).

A hipótese clássica de patogenia da OA centrada na cartilagem articular considera a disfunção dos condrócitos como evento primário, independentemente dos mecanismos desencadeadores. Em condições normais, o condrócito funciona como um sensor mecânico e bioquímico. É capaz de responder a estímulos mecânicos e mudanças estruturais na MEC que o circunda, assim como a fatores de crescimento intrínsecos e extrínsecos, citocinas e outros mediadores inflamatórios (GOLDRING; MARCU, 2009). Seu fenótipo é fisiologicamente caracterizado pela expressão de genes específicos para moléculas constituintes ou reguladoras da MEC, visando à manutenção do anabolismo da cartilagem articular (BERTRAND et al., 2010). Em condições de estresses mecânicos ou bioquímicos os condrócitos se alteram, tendendo a um fenótipo catabólico, caracterizado pelo aumento na produção e ativação de diferentes fatores que agem como mediadores ou efetores da perda progressiva da cartilagem (PULSATELLI et al., 2013). Nestas situações, passam a sintetizar concentrações elevadas de citocinas inflamatórias, tais como a IL-1 β , o TNF- α , a IL-8 e a IL-6; de enzimas degradadoras, tais como as MMPs e agrecanases do tipo ADAMTS (uma desintegrina e metaloproteinase com motivos trombospondina), além de outros mediadores inflamatórios, como PGE₂, EROs e o NO (SAMUELS; KRASNOKUTSKY; ABRAMSON, 2008) e quimocinas (KAMM; NIXON; WITTE, 2010; PULSATELLI et al., 2013). Resumidamente, estas moléculas contribuirão para a degradação da cartilagem dada sua capacidade de aumentar a produção e de ativar MMPs, de inibir a biossíntese de proteoglicanos e colágeno e

de induzir a apoptose dos condrócitos (NOTOYA et al., 2000; HENROTIN; KURZ; AIGNER, 2005; ABRAMSON, 2008; ATTUR et al., 2008).

Estudos em equinos portadores de OA, demonstraram serem os condrócitos fonte importante de citocinas inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α , observando-se aumento da concentração de receptores para ambas as citocinas nestas células. A produção de TNF- α mostrou-se aumentada em todos os estágios de desenvolvimento da OA, tanto na cartilagem como na membrana sinovial, e seu papel como contribuinte na progressão da enfermidade na espécie pode ser mais relevante do que o presumido anteriormente (KAMM; NIXON; WITTE, 2010).

A cartilagem articular é não somente fonte, mas também é alvo de moléculas sinalizadoras (BERTRAND et al., 2010). A depleção do conteúdo de proteoglicanos e a desestabilização da rede de colágeno resultam em proliferação e alteração do fenótipo característico dos condrócitos, evidenciando a influência dominante que a composição da MEC exerce sobre o fenótipo destas células (PULSATELLI et al., 2013). Fragmentos proteicos produzidos durante a degradação da MEC podem estimular e retroalimentar a destruição da matriz, na medida em que a estimulam a incrementar a produção de citocinas inflamatórias, quimocinas e MMPs, além de ativar o sistema imune inato (LOESER et al., 2012). A interação entre o condrócito e a MEC é fundamental para a manutenção da homeostase da cartilagem, uma vez que não existe interação célula a célula na matriz; no entanto, ela também alimenta o ciclo de eventos destrutivos que têm início quando se instala a enfermidade articular. A interação entre o elemento celular e seu meio ocorre através dos vários receptores presentes no condrócito, como aqueles para citocinas e quimocinas e os que detectam a composição das moléculas da matriz. Ela resultará na ativação de vias de comunicação que afetarão o comportamento do condrócito, de início objeto, mas em seguida efector da resposta da cartilagem frente aos estímulos nocivos (LOESER et al., 2012; PULSATELLI et al., 2013).

As mudanças sofridas pela cartilagem articular e pelo fenótipo dos condrócitos na OA são acompanhadas de mineralização da cartilagem. A diferenciação hipertrófica e a calcificação da matriz ocorrem fisiologicamente durante o crescimento longitudinal dos ossos, através do processo de ossificação endocondral na cartilagem de crescimento, mas também ocorrem na cartilagem afetada pela OA. O processo de ossificação endocondral é particularmente importante para o desenvolvimento, crescimento e reparo dos ossos longos. Nele, células diferenciadas da cartilagem passam por uma série de eventos de diferenciação tardia, incluindo proliferação celular e maturação dos condrócitos, que culminam com a

hipertrofia. Fisiologicamente, após a invasão da zona de condrócitos hipertróficos por vasos oriundos da ossatura subcondral, a maioria das células hipertróficas sofre apoptose e a placa cartilagínea transforma-se em osso trabecular. Na cartilagem articular sadia, os condrócitos mantêm um fenótipo estável, resistindo à proliferação e à diferenciação. Na cartilagem acometida pela OA, contudo, os condrócitos sofrem diferenciação terminal e hipertrofia próximas às áreas de matriz calcificada e adjacentes às áreas de lesões superficiais, em resposta à injúria. A calcificação da MEC também é um evento comum na OA e frequentemente associado à diferenciação hipertrófica dos condrócitos. Vários fatores reguladores estão envolvidos na diferenciação tardia dos condrócitos, como os hormônios do crescimento, da tireoide, andrógenos, estrógenos e glicocorticoides. Também há evidências de que citocinas inflamatórias, como a IL-1 β , estejam envolvidas neste processo (BERTRAND et al., 2010).

A deterioração da função dos condrócitos acompanha as alterações na matriz cartilagínea e culmina com a suspensão do ciclo de replicação celular, evento conhecido como senescência dos condrócitos. A senescência tem um papel importante na progressão da degeneração articular, afetando adversamente as tentativas de reparo e regeneração da cartilagem. Nos humanos, é um fenômeno claramente associado à idade, assim como a própria OA, e resulta da erosão dos telômeros e do dano oxidativo aos condrócitos (MARTIN; BUCKWALTER, 2003); contudo é passível de ocorrência em indivíduos jovens, onde estes fatores desencadeantes estejam presentes.

Os telômeros, sequências de DNA presentes nas porções finais dos cromossomos, são necessários para replicação e para a manutenção da função normal, na medida em que previnem sua degradação enzimática e aglutinação. O crescimento da maioria das células somáticas é limitado pela erosão dos telômeros, fenômeno que ocorre, inevitavelmente, a cada ciclo de divisão celular. Sugere-se que o envelhecimento celular seja regulado por um relógio genético intrínseco, associado à erosão destas estruturas. Mesmo uma baixa atividade mitótica, como a que apresentam os condrócitos, seria suficiente para resultar em erosão dos telômeros especialmente na vida adulta, considerando-se um prazo de décadas. Esta erosão progressiva dos telômeros, consequente aos sucessivos ciclos de divisão celular, resulta na senescência replicativa das células. Alternativamente, a atividade mitótica dos condrócitos, aumentada após a injúria à cartilagem, poderia acelerar o processo de erosão, e explicar a associação entre sobrecarga repetitiva e desenvolvimento de degeneração articular (BUCKWALTER; LANE, 1997). O encurtamento dos telômeros não apenas desencadeia a senescência replicativa em condições fisiológicas, mas os telômeros também agem como

sensores cumulativos para o estresse oxidativo, através do acúmulo de fitas de DNA simples quebradas e do encurtamento acelerado. Ainda, em condições crônicas de estresse moderado, o encurtamento dos telômeros é responsável pelo desencadeamento de um fenômeno denominado de senescência prematura (TOUSSAINT et al., 2000; TOUSSAINT; MEDRANO; VON ZGLINICKI, 2000).

O dano celular cumulativo proveniente do estresse oxidativo fornece uma explicação alternativa para a senescência dos condrócitos e fornece evidências para o papel do envelhecimento na deterioração das funções destas células. A senescência pode ser prematuramente induzida pelo estresse oxidativo subletal, e neste caso é chamada de senescência prematura induzida por estresse (SIPS) (TOUSSAINT et al., 2000; TOUSSAINT; MEDRANO; VON ZGLINICKI, 2000, YUDOH et al., 2005). Protocolos de exposição crônica e aguda a estresse oxidativo mostraram-se capazes de induzir prematuramente a senescência celular (BALIN; FISHER; CARTER, 1984; MICHIELS et al., 1990; VON ZGLINICKI et al., 1995) e de induzir o encurtamento dos telômeros (VON ZGLINICKI, 2002).

A produção de EROs, mediada por injúria mecânica ou em resposta a citocinas e fragmentos da MEC, contribui para a morte celular e a apoptose (DEL CARLO; LOESER, 2008; CARAMÉS et al., 2010). O estresse oxidativo também resulta em dano e disfunção mitocondrial, reduzindo a viabilidade dos condrócitos e aumentando a ocorrência de senescência e apoptose entre estas células (GRISHKO et al., 2009).

A degeneração da cartilagem articular também contribui, direta ou indiretamente, para o desencadeamento da apoptose, uma vez que acarreta em perda do sinal de sobrevivência oriundo da MEC para os condrócitos (KIM et al., 2003). Como todas as células, os condrócitos requerem indicações ou sinais extracelulares provindos da matriz e de fatores de crescimento, como o IGF-1, para manterem-se vivos. Eles morrem quando estes sinais são perdidos ou removidos e, frequentemente, o mecanismo para este tipo de morte é a apoptose. A apoptose, ou morte celular programada, ocorre fisiologicamente, de maneira ordenada e regulada, na zona hipertrófica da placa de crescimento, onde a morte dos condrócitos é etapa normal e necessária para a finalização do processo de ossificação endocondral. Diferentemente disto, a morte celular por necrose é um evento inespecífico, que ocorre em casos de severo dano celular e tissular. Os dois mecanismos de morte celular, ou a combinação deles, podem contribuir para a depleção de condrócitos da cartilagem articular e a progressão da OA (DEL CARLO; LOESER, 2008).

A sobrevivência dos condrócitos é essencial para o funcionamento adequado da cartilagem. Dada à reduzida capacidade replicativa destas células, a redução gradual do seu número está ligada à falência articular. A perda dos condrócitos resultante de injúria, necrose ou apoptose subtrai a cartilagem articular, de maneira irreparável, de seu único elemento celular, provedor e mantenedor da MEC. A morte celular está intimamente ligada à patogenia, à localização, à severidade da OA equina (MOBASHERI, 2002; THOMAS et al., 2007; MUELLER; TUAN, 2011) e à degeneração definitiva da cartilagem articular (KIM et al., 2003).

2.1.4 A membrana sinovial

A membrana sinovial é o tecido colágeno de revestimento interno da cápsula articular, que fica em contato com o líquido sinovial. Ela representa uma interface para troca de fluidos, além de prover suprimento sanguíneo e contribuir para a composição do líquido sinovial através da síntese de ácido hialurônico (AH). Fisiologicamente, a membrana sinovial é responsável pela produção do líquido sinovial, que nutre e lubrifica a articulação, além de auxiliar na eliminação de subprodutos indesejáveis. Ela é composta de uma primeira camada, a íntima ou membrana sinovial, que consiste em um revestimento luminal com 1 a 5 células de profundidade, um plexo capilar e uma rede de vasos linfáticos, situada mais profundamente. A íntima é desenhada para favorecer as trocas de solutos entre os capilares e a cavidade articular: ela é desprovida de uma membrana basal, espaços intercelulares estão presentes e seus capilares são fenestrados para a cavidade articular. Ainda, a íntima sinovial adota uma configuração tridimensional, na dependência de variáveis biomecânicas, às quais se adapta. Em áreas de maiores demandas mecânicas, a membrana sinovial é achatada e fica sobre uma camada sub íntima resistente e fibrosa; nos recessos sinoviais ela assume uma conformação tridimensional em forma de vilos, sendo mais vascularizada, favorecendo a ocorrência de processos de troca de solutos, macromoléculas e AH. A segunda camada, a sub íntima ou sub membrana sinovial, é uma camada de suporte composta de tecido adiposo, areolar ou fibroso (BERTONE, 2004).

As células da íntima incluem um grande número de fibroblastos sinoviais (células do tipo B) que produzem colágenos, fibronectina e AH, de fagócitos mononucleares (células do tipo A), com lisossomos e um desenvolvido Complexo de Golgi e de células do tipo C, um

tipo intermediário entre as anteriores. As mais abundantes são as do tipo B, enquanto as células do tipo A perfazem de 10 a 20% da população total. Importante é notar que estas células de revestimento sinovial são capazes de sintetizar uma variedade de mediadores solúveis implicados na patogenia da OA, e que a capacidade de expressar estas substâncias evidencia o papel da membrana sinovial na instalação da OA (CARON, 2003).

Os macrófagos sinoviais exercem um papel importante na produção de enzimas degradadoras e de mediadores inflamatórios, particularmente a IL-1 e o TNF- α . A combinação dos efeitos destas citocinas parece dirigir as respostas inflamatórias e destrutivas dos fibroblastos sinoviais, que produzirão agreganases e MMPs. Estudos com depleção de macrófagos sinoviais mostraram que a produção de IL-1 e TNF- α na membrana sinovial de pacientes portadores de OA é largamente dependente de macrófagos CD 14+. A depleção destes macrófagos leva à diminuição das concentrações de IL-1 e TNF- α , que por sua vez, podem inibir a liberação de IL-6, quimocinas e MMPs (BONDESON et al., 2006).

A membrana sinovial é então, à semelhança da cartilagem e do osso subcondral, fonte de mediadores inflamatórios que podem ser detectados no líquido sinovial, em resposta à injúrias articulares de qualquer natureza. As duas principais citocinas envolvidas na patogenia da OA, a IL-1 β e o TNF- α são produzidas na membrana sinovial não só por células mononucleares, mas também por sinoviócitos ativados. Este fenômeno local afeta a articulação como um todo, uma vez que estas moléculas pró-inflamatórias se difundem para o líquido sinovial. Elas atuarão sobre os condrócitos, suprimindo a síntese de MEC, promovendo o catabolismo da cartilagem e estimulando a produção de outras citocinas e mediadores inflamatórios, como a IL-6, a IL-8 e a PGE₂, amplificando a resposta inflamatória (LEY et al., 2007; SELLAM; BERENBAUM, 2010; LOESER et al., 2012). A IL-1 β e o TNF- α a podem estimular sua própria produção, de forma autócrina, uma vez que os fibroblastos sinoviais possuem altas concentrações de receptores para ambas as citocinas. A membrana sinovial contém, ainda, quantidades elevadas do fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), quimocinas, e moléculas de adesão.

Desde a identificação da IL-1 como fator proveniente também da membrana sinovial e capaz de destruir a cartilagem, *in vitro*, muito progresso foi feito em relação à compreensão do papel desta estrutura na condução das respostas catabólicas dos condrócitos. O TNF- α também é prontamente detectável no líquido sinovial e na membrana sinovial de pacientes humanos e equinos com OA. (BILLINGHURST; FRETZ; GORDON, 1995; SCHLAAK et al., 1996 KAMM; NIXON; WITTE, 2010). A IL-17, apesar de detectada em líquido sinovial de pacientes humanos e implicada na evolução da OA, não se apresentou elevada no líquido

sinovial equino proveniente de articulações do carpo acometidas por OA (KAMM; NIXON; WITTE, 2010).

Ainda na membrana sinovial afetada pela OA encontram-se adipocinas, citocinas classicamente liberadas pelo tecido adiposo, tais como a visfatina, a adiponectina e a leptina. Elas têm potencial envolvimento patogenia da OA, como mediadores da inflamação e destruição da cartilagem articular. Nas articulações afetadas pela OA o tecido sinovial parece ser a principal fonte produtora de adipocinas (PRESLE et al., 2006). A presença da leptina foi demonstrada em osteófitos humanos. Ela induz a síntese de TGF- β e IGF-1, estimulando a atividade anabólica dos condrócitos, e pode ser um fator conector entre a obesidade e OA (TERLAIN et al., 2005). As adipocinas contribuem também para o estado inflamatório sistêmico sutil em pacientes obesos ou portadores de síndrome metabólica e podem afetar diretamente a homeostase da cartilagem articular. Elas também podem ser produzidas por condrócitos e agir localmente na promoção da destruição da cartilagem articular, favorecendo a instalação da OA (GOLDRING; OTERO, 2011; BERENBAUM, 2013; SOKOLOVE; LEPUS, 2013).

Em resposta a injúrias articulares, como uso excessivo e a instalação de processos inflamatórios, ocorre também uma alteração na morfologia e na distribuição dos elementos celulares da membrana sinovial, com os macrófagos passando a perfazer de 50 a 70% da população da íntima, e um aumento da expressão de integrinas. A expressão de moléculas de adesão pelas células da íntima sinovial serve para dirigir a migração de leucócitos nas afecções articulares. Ainda nesta situação, ocorre proliferação dos fibroblastos da íntima, com proliferação celular e hiperplasia sinovial, de um modo geral (BERTONE, 2004; SUTTON et al., 2009).

Outra alteração observada na membrana sinovial de articulações acometidas pela OA é a proliferação de células endoteliais. A produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), um fator pró angiogênico, está aumentada na membrana sinovial de articulações acometidas por OA. É reconhecida a estreita ligação entre a angiogênese e a inflamação e esta relação pode afetar a progressão da doença e a presença da dor. A inflamação pode estimular a angiogênese e, por sua vez, a angiogênese pode facilitar e perpetuar a inflamação. A resposta inflamatória é perpetuada pelo transporte de células inflamatórias, nutrientes e oxigênio para o local inflamado, através de vasos neo formados (SELLAM; BERENBAUM, 2010).

A despeito de uma longa história que categorizava a OA como uma forma não inflamatória de artrite, estudos histológicos de membrana sinovial descreveram infiltrados inflamatórios de células mononucleares, hipertrofia e hiperplasia de células de revestimento

sinovial (SELLAM; BERENBAUM, 2010; SCANZELLO; GOLDRING, 2012). Atualmente, a inflamação da membrana sinovial é reconhecida como fator importante no desenvolvimento da OA, estando presente desde os estágios iniciais de seu estabelecimento. Alterações histológicas da membrana sinovial, evidentes em casos mais avançados de OA, também estão presentes em suas fases iniciais, quando o dano à cartilagem ainda é menos extensivo, sugerindo a participação precoce da inflamação sinovial na patogenia da OA (SELLAM; BERENBAUM, 2010). A combinação de modalidades diagnósticas de imagem de alta sensibilidade com a visualização artroscópica direta, confirma que a inflamação da membrana sinovial está presente antes que uma degeneração visível da cartilagem tenha ocorrido, e que precede o aparecimento de alterações radiográficas. Mesmo na OA iniciante ou assintomática, sem componente inflamatório ativo aparente, técnicas de coloração imunológica da membrana sinovial proliferada detectam a presença de quimocinas, estromelisina e colagenase, moléculas capazes de iniciar a degradação cartilagem articular. Estudos que demonstram a significativa inflamação sinovial nos estágios iniciais da OA sugerem, ainda, a existência de uma janela terapêutica nesta fase, onde o combate à inflamação é oportuno e recomendado, e talvez seja a forma mais efetiva de tratamento e prevenção da OA (SOKOLOVE; LEPUS, 2013).

Apesar da membrana sinovial não ser o único componente articular envolvido na inflamação associada à OA, ela é um sítio importante de alterações macroscópicas e microscópicas (SELLAM; BERENBAUM, 2010). Dos três tecidos articulares que participam na progressão da enfermidade, o mais inflamatório, a nível molecular, é a membrana sinovial. O processo inflamatório repercute sobre todos os componentes articulares, de forma autócrina e parácrina, num ciclo onde degradação da cartilagem e inflamação da membrana sinovial se perpetuam.

2.1.5 O Osso Subcondral

O osso subcondral situa-se na região epifisária, na interface entre a cartilagem articular e o esqueleto rígido. A camada mais profunda da cartilagem articular é calcificada, mas não ossificada, constituindo-se numa zona transicional entre a cartilagem não calcificada e a placa de osso subcondral. A fronteira entre as zonas calcificada e não calcificadas da cartilagem é conhecida como *tidemark*, ou marca da maré, e aparece como uma linha basofílica nos cortes

histológicos. As camadas mais profundas da cartilagem recebem seu suporte nutricional do osso subcondral, mais do que da membrana sinovial, e contém condrócitos que vivem em um microambiente distinto daquele em que vivem os condrócitos das camadas mais superficiais. Abaixo da cartilagem calcificada está a placa relativamente inflexível de osso cortical subcondral (SURI; WALSH, 2012).

A ossatura subcondral tem dupla função, a de absorção de forças mecânicas e a de manutenção do formato da articulação. Ela promove a maior parte do amortecimento para a articulação por ser mais volumosa do que a cartilagem articular, apesar da maior capacidade de deformação da última. Esta propriedade do osso subcondral depende do equilíbrio entre resistência adequada e suficiente capacidade amortecedora, e é necessária para manter a normalidade do ambiente articular. Em relação à segunda função, a ossatura subcondral fornece os meios para manutenção de superfícies articulares incongruentes, o que é ideal para um perfeito funcionamento da articulação, por manter as superfícies externas em contato, enquanto no centro da articulação elas permanecem afastadas (KAWCAK et al., 2001).

A junção osteocondral de articulações afetadas pela OA apresenta alterações estruturais, bioquímicas e biomecânicas. Elas podem ser definidas como perda de integridade, dado que a barreira entre a cavidade sinovial e o osso subcondral está comprometida, ou como uma capacidade de adaptação plástica, uma vez que estruturas adjacentes se moldam para criar um novo tecido, com diferentes características morfológicas e funcionais. A atividade osteoclástica aumentada permite que canais atravessem a placa subcondral e ganhem a zona de cartilagem não calcificada, enquanto fissuras da superfície articular se estendem em direção a *tidemark* e para o interior da placa subcondral. Como resultado, os compartimentos subcondral e sinovial se tornam cada vez mais contíguos, com fluidos, moléculas químicas e forças físicas permeando a junção osteocondral, agora mais permissiva. Em adição a esta quebra na integridade da barreira osteocondral que ocorre na OA, mudanças fenotípicas comprometem a capacidade do tecido de desempenhar as funções de suporte e amortecimento (SURI; WALSH, 2012), e contribuindo para o desenvolvimento da OA (CASTAÑEDA et al., 2012).

O papel da ossatura subcondral é atualmente considerado como primordial na patogenia da OA, a despeito do conceito tradicional que associa a OA a uma disfunção primária da cartilagem articular em humanos e equinos (KAWCAK et al., 2001; CRUZ; HURTIG, 2008; CASTAÑEDA et al., 2012). Contudo, ainda permanece indeterminado se as alterações na ossatura subcondral precedem a degradação da cartilagem ou se são consequentes ao dano ocorrido nesta estrutura (CASTAÑEDA et al., 2012). Dados recentes

sugerem que alterações microestruturais no osso subcondral podem ocorrer antes, durante ou depois do dano à cartilagem articular (PASTOUREAU; CHOMEL; BONNET, 1999; DAY et al., 2001; LAJEUNESSE; REBOUL, 2003; HAYAMI et al., 2006).

Durante o curso da OA a ossatura subcondral apresenta-se como um tecido extremamente ativo, que sofre mudanças estruturais através de aumentado remodelamento ósseo, de micro fraturas, da ocorrência de angiogênese e de esclerose óssea nos estágios finais (CASTAÑEDA et al., 2012). Os osteoblastos e os osteoclastos são os efetores das respostas anabólicas e catabólicas, respectivamente. Estes elementos celulares estão em comunicação, e citocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas e leucotrienos produzidos por eles, mais particularmente pelos osteoblastos, atravessam a interface cartilagem-osso, promovendo a destruição da cartilagem (WESTACOTT et al., 1997). O fenótipo dos osteoblastos na OA difere daquele dos osteoblastos normais, e manifesta-se na forma de respostas alteradas em relação a diferentes estímulos. Os osteoblastos são capazes de influenciar células de outros tecidos articulares, como os condrócitos, alterando sua síntese de proteoglicanos e de MMPs, através da sinalização por fatores de crescimento, como o fator de crescimento do hepatócito (HGF). Ainda, os osteoblastos de regiões escleróticas da ossatura subcondral são capazes de afetar os condrócitos suprajacentes, alterando seu perfil para padrões mais catabólicos ou anti-anabólicos. Contudo, o papel dos osteoclastos na patogenia da OA ainda não é claro, e apenas recentemente a participação destas células nas erosões ósseas foi demonstrado (PETTIT et al., 2001; KARSDAL et al., 2014)

Durante os processos de remodelamento mediados por células, a arquitetura e as propriedades da ossatura periarticular cortical e trabecular se modificam. O ciclo de remodelamento começa pela ativação de superfícies ósseas quiescentes e início da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. O processo reabsortivo é seguido por uma fase de formação óssea, mediada por osteoblastos. Em condições fisiológicas, a quantidade de osso removida nas fases de reabsorção e reposta nas de formação é equilibrada, de sorte que a massa óssea é mantida, apesar da forma e da arquitetura óssea estarem sendo modificadas. Este sistema permite a adaptação do osso às forças que sobre ele incidem, de forma dinâmica, e representam um mecanismo para reparação do dano sofrido (BURR, 2004; MARTIN, 2007). À avaliação histopatológica da junção osteocondral, observa-se duplicação da *tidemark*, afinamento da cartilagem articular, presença de vasos da ossatura subcondral invadindo a cartilagem calcificada e aumento da espessura da ossatura subcondral.

Estas alterações afetam as propriedades biomecânicas da cartilagem articular suprajacente e também a relação entre ela e a ossatura subcondral (CASTAÑEDA et al.,

2012). A rigidez da ossatura subcondral pode diminuir suas propriedades viscoelásticas e reduzir sua capacidade de absorver choques, submetendo a cartilagem articular a cargas mecânicas significativamente maiores e incrementando os riscos de falência (RADIN; ROSE, 1986). Dada sua estreita relação, o dano sofrido pela cartilagem articular vai influenciar negativamente a ossatura subcondral subjacente, perpetuando o ciclo de eventos deletérios na articulação acometida pela OA.

Um sistema claramente envolvido nas anormalidades da microarquitetura da ossatura subcondral e da cartilagem na OA é a via de sinalização que inclui o RANKL ou ligante do ativador de receptor do NF- κ B, presente nos osteoblastos da ossatura subcondral. Este sistema parece ser o responsável pelo recrutamento de osteoclastos ativos na placa subcondral de pacientes acometidos por OA, levando à reabsorção óssea. Ele possui duplo mecanismo de ação no desenvolvimento da OA, primeiramente através de seu efeito no remodelamento da ossatura subcondral pelo estímulo da osteoclastogênese e, em segundo lugar, através do efeito direto na homeostase dos condrócitos (BELLIDO et al., 2010; PANTSULAIA; KALICHMAN; KOBLYANSKY, 2010).

Outras alterações observadas na ossatura periarticular, associadas a OA, são o edema de medula óssea e os osteófitos. O termo “edema de medula óssea” refere-se a áreas de aumento de intensidade de sinal, detectadas através de exame de ressonância magnética, que se correlacionam com a severidade das manifestações dolorosas, da progressão da OA e coincidem com as áreas mais severas de perda de cartilagem. A análise histológica destas áreas revela a presença de micro fraturas do osso trabecular, em vários estágios de reparação, associadas à reposição fibrosa da medula óssea e aumento da ativação das unidades de remodelamento ósseo (TALJANOVIC et al., 2008; GOLDRING; GOLDRING, 2010). Este tipo de alteração óssea não tem implicações apenas para a ossatura subcondral, mas também compromete de forma relevante a integridade da cartilagem articular. Evidências recentes demonstram associação entre áreas de alterações na estrutura óssea e áreas de cartilagem danificada, em articulações acometidas por OA (CASTAÑEDA et al., 2012).

Os osteófitos, por sua vez, são proliferações ósseas ou fibrocartilagíneas que caracterizam a OA, radiograficamente. Sua gênese está associada à proliferação de células periosteais na margem articular; estas células subsequentemente se diferenciam em condrócitos, que sofrem hipertrofia e através do processo de ossificação endocondral, criam uma proliferação óssea na margem articular. A produção local de fatores de crescimento, incluindo o TGF- β , que está fisiologicamente implicado no processo de ossificação endocondral de formação do osso, tem papel importante na formação dos osteófitos. Sua

ocorrência em sítios de sobrecarga articular também implica fatores mecânicos locais em sua formação, e evidencia que os osteófitos são, de fato, um recurso para tentar preservar a estabilidade articular (BLANEY DAVIDSON; VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2007; VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2007).

De forma geral, anormalidades subcondrais são basicamente reabsortivas nas fases iniciais da OA e reparadoras (com formação de osteófitos e esclerose óssea) nos estágios posteriores (BRANDT et al., 1991; CRUZ; HURTIG, 2008; PELLETIER et al., 2011). Desta forma, tanto o aumento como a redução da massa óssea podem ser fatores predisponentes para a OA. O dano à cartilagem articular é induzido não apenas pelo aumento do remodelamento ósseo, mas pelo aumento da fragilidade e perda da qualidade da ossatura subcondral. Apesar de o volume ósseo poder estar aumentado, uma redução no modo elástico do osso subcondral trabecular é muitas vezes verificada. Este aumento na “maciez” do osso devido a um decréscimo na massa óssea pode ser secundário à incompleta mineralização associada ao remodelamento ósseo aumentado.

2.1.6 A OA e o equino jovem

A OA nos humanos é classicamente definida como uma enfermidade articular ligada ao envelhecimento, sendo uma das principais causas de dor e disfunção nos indivíduos idosos (LOESER, 2004; ANDERSON et al., 2011; LEE et al., 2013). Nos equinos, por outro lado, a afecção acomete também animais jovens, demonstrando que o envelhecimento não é fator imprescindível para a instalação da OA. As causas e implicações desta diferença não são claramente conhecidas, mas podem refletir aspectos vitais desta enfermidade, não somente na espécie equina, mas também em outras, e que ainda não foram abordados com a devida ênfase. Entre outras, elas certamente traduzem particularidades da movimentação nas duas espécies.

O equino é um animal cursorial, e seu sistema músculo esquelético é adaptado para maximizar a eficiência locomotora, desde uma idade muito precoce, para evitar predadores. Os cavalos galopam poucas horas após o nascimento e iniciam o treinamento para competições atléticas antes de concluírem seu desenvolvimento esquelético. Quantificar a atividade física que ocorre num período de 24 horas é muito difícil em animais não confinados e altamente ambulatoriais, como os equinos. Neste período, atividades de alto

impacto sobre seu sistema músculo esquelético podem ocorrer em função de atividades habituais, como manter-se em estação, caminhar ou exercitar-se em liberdade (FIRTH, 2006). O nível de exigência sobre os ossos, articulações, tendões e músculos que se verifica nos equinos não tem equivalência com aquele observado em indivíduos da espécie humana, em fase de desenvolvimento. A diferença em magnitude e frequência de cargas que incidem sobre o sistema musculoesquelético em desenvolvimento nas duas espécies está provavelmente implicada no tipo de resposta das estruturas que o compõem frente a estímulos mecânicos.

No contexto de dissimilaridades entre a apresentação da OA no homem e no equino, a introdução do conceito de osteoartrite pós-traumática (OAPT) é oportuna. A OAPT é uma entidade clínica comum em articulações diartrodiais, causada por dano à cartilagem articular e/ou ao osso subcondral, devido à incongruidades das superfícies articulares ou instabilidade articular. A origem pode ser o trauma agudo ou crônico, fraturas articulares, lesões de cápsula articular, ligamentos ou meniscos. Ao contrário da OA idiopática, que tende a afetar indivíduos mais velhos, a OAPT ocorre em pacientes mais jovens e se desenvolve e progride mais rapidamente, na dependência da magnitude e da natureza do(s) evento(s) desencadeador(es) (KRAMER; HENDRICKS; WANG, 2011).

A participação em atividades esportivas e a atividade física vigorosa aumentam o risco de injúria articular por uso e desgaste de seus componentes. O impacto e as forças de tensão a que os componentes articulares estão submetidos nestas situações de alta demanda excedem, por vezes, sua tolerância mecânica, levando à instabilidade articular. As lesões articulares, por sua vez, aumentam o risco de degeneração sinovial, culminando com a OAPT (BUCKWALTER, 2003).

Não há estudos demonstrando a ocorrência da OAPT em equinos, mas sua definição e etiologia traumática se ajustam com maior propriedade ao que se observa na espécie, onde a OA não é uma enfermidade do idoso. Os eventos subsequentes à OAPT têm muito em comum com aqueles observados durante a instalação e o desenvolvimento da OA, tal como é classicamente definida, como dano à MEC, inflamação da membrana sinovial e alterações ósseas (KRAMER; HENDRICKS; WANG, 2011). Contudo, os mecanismos que levam à instalação da OA nos indivíduos jovens merecem particular atenção.

O grande benefício de reconhecer a OAPT e distingui-la da OA é a possibilidade de intervir terapêuticamente nos momentos imediatamente seguintes à sua ocorrência e de avançar nas pesquisas para estabelecimento de um diagnóstico precoce (LOTZ, 2010; BUCKWALTER et al., 2013). Um dos progressos mais importantes feitos através do estudo da OAPT foi a compreensão de que enquanto a injúria mecânica causa dano tecidual direto, a

OAPT não é uma consequência direta ou inevitável deste dano inicial. Estudos *in vitro* mostram que impactos de alta energia sobre as superfícies articulares resultam na morte de poucos condrócitos, mas que a morte destas células aumenta de maneira constante nas 48 horas seguintes ao evento traumático inicial. Estes resultados sugerem que a liberação de mediadores após o trauma seja o fator mais deletério e causador de progressiva morte celular (TOCHIGI et al., 2011).

A identificação *in vitro* de mediadores biológicos pós-traumáticos de degradação de matriz e morte celular, aliada à melhor compreensão de como o dano causado pelo maior contato entre superfícies articulares leva à perda de cartilagem, cria oportunidades para o desenvolvimento de intervenções biológicas e mecânicas para diminuir os riscos da OAPT (MARTIN; BUCKWALTER, 2006; BEECHER et al., 2007; CATTERALL et al., 2010; ANDERSON et al., 2011; TOCHIGI et al., 2011). Em adição a oportunidade de diminuir os riscos de instalação da OAPT após uma injúria articular, seu estudo oferece possibilidade de investigar como a OA se instala a partir de um evento inicial. Este estudo não é possível na população idosa acometida pela OA onde, em geral, as circunstâncias e a natureza dos eventos que deram início à degeneração articular são de difícil ou impossível identificação (BUCKWALTER et al., 2013)

Atualmente, medidas preventivas em relação à OAPT não são extensivamente exploradas, apesar de pacientes acometidos por ela apresentarem maior risco de desenvolver OA. Estes pacientes são a população ideal para testes de medidas terapêuticas e preventivas e investigação de novas abordagens diagnósticas (LOTZ, 2010). Testes *in vitro* demonstram que tratamentos com antioxidantes melhoram a viabilidade de condrócitos na cartilagem, após trauma articular, sugerindo que as EROs também sejam liberadas em resposta a ele. A administração oportuna de captadores de radicais livres no período imediato pós-trauma articular pode, portanto, reduzir o dano oxidativo e prevenir a morte celular, causados pelo impacto mecânico, desacelerando a progressão da OA (GOODWIN et al., 2010).

2.2 A OSTEOCONDROSE

A osteocondrose (OC) é uma importante afecção ósteo-articular que acomete humanos, equinos, cães e porcos. Ela é definida como uma perturbação focal do processo de ossificação endocondral, resultante da incidência de forças biomecânicas de compressão, tensão e cisalhamento sobre o esqueleto em desenvolvimento. O evento central no desenvolvimento da patogenia desta afecção é o dano vascular, que levará à falta de suprimento sanguíneo para a cartilagem de crescimento e à osteonecrose (YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007; DENOIX et al., 2013). Por ser de etiologia multifatorial, o desenvolvimento da OC é potencializado pela existência de uma série de fatores predisponentes, como hereditariedade, desequilíbrios nutricionais, crescimento rápido, trauma e conformação anatômica (SCHENCK; GOODNIGHT, 1996; EKMAN; CARLSON, 1998).

A ossificação endocondral é o processo através do qual o modelo cartilaginoso embrionário é gradualmente substituído por osso, contribuindo para o desenvolvimento longitudinal do esqueleto. Durante a ossificação endocondral, os condrócitos proliferam, sofrem hipertrofia e morrem; a matriz extracelular que eles constroem é invadida por vasos sanguíneos, osteoclastos, células da medula óssea e osteoblastos, sendo que estes últimos serão responsáveis pela deposição de osso nos resquícios de matriz cartilágnea (MACKIE et al., 2008).

2.2.1 Apresentação

Distúrbios no processo de ossificação endocondral levam à retenção e engrossamento da cartilagem nas placas de crescimento epifisárias ou fisárias, resultando em aparecimento de um núcleo cartilágneo. Estas lesões primárias podem progredir e causar posteriores danos à articulação, resultando em fraturas subcondrais, lesões subcondrais semelhantes a cistos, *flaps* de cartilagem, separação de fragmentos osteocondrais, osteocondrite e sinovite (JEFFCOTT, 1991; LAVERTY; GIRARD, 2013). O desfecho deste processo está na dependência da anatomia articular, da carga biomecânica que a articulação suporta, de seu espectro de movimentação e da distribuição da pressão local sobre as superfícies articulares (DENOIX et al., 2013). Apesar de sua forma particular de evolução, as lesões causam efeitos negativos

sobre a performance e a longevidade do animal, quando observados a longo prazo (DISTL, 2013).

As lesões que causam fragmentação osteocondral podem ser caracterizadas como latens, manifesta ou dissecans, dependendo do grau de dano e da eficácia do processo de reparação que desencadeiam (EKMAN; CARLSON; VAN WEEREN, 2009). Na forma dissecante (OCD) há um fragmento destacado, caracteristicamente. Na forma manifesta não existe um fragmento solto, mas as lesões podem ser detectadas através de exame radiográfico de rotina. A forma latens não é detectada radiograficamente e representa uma lesão muito precoce da cartilagem de crescimento, anteriormente caracterizada como discondroplasia.

A fragmentação osteocondral da superfície articular resulta de sobrecarga, pelas forças compressivas ou de cisalhamento, em áreas de relevo proeminente. É encontrada nas porções mais anguladas das articulações, como as cristas, e bons exemplos são a crista lateral da tróclea femoral ou a crista sagital do côndilo metacarpiano/metatarsiano. A fragmentação osteocondral resulta da ossificação da camada osteogênica profunda da cartilagem epifisária.

A fragmentação osteocondral periarticular é uma outra forma de OCD, induzida pela compressão em completa flexão ou extensão, nas margens peri articulares angulosas. É encontrada em articulações com amplo espectro de movimentação e é característica de regiões como a margem dorsal da crista intermédia da cóclea tibial e a margem dorsal do aspecto proximal da falange proximal.

As lesões subcondrais císticas juvenis podem resultar de compressão em locais da superfície articular sujeitos à máxima pressão e/ou apresentar-se naqueles locais onde houve falência da ossificação endocondral, razão pela qual são consideradas como manifestações de OC. As lesões localizam-se frequentemente em superfícies articulares convexas, sujeitas a altas sobrecargas, tais como o côndilo medial do fêmur, a extremidade distal da segunda falange, o côndilo metacarpiano/metatarsiano ou o côndilo distal do rádio. As lesões também podem ser encontradas em áreas específicas onde haja concentração de cargas, como o platô da tíbia e as superfícies articulares metacarpo-falangeanas ou interfalangeanas. Estas formações císticas são geralmente diagnosticadas em potros jovens e em cavalos puro sangue de corrida aos dois anos de idade, quando do início de seu treinamento. De outra forma, as lesões císticas subcondrais adquiridas, que não se caracterizam como uma forma de OC, podem se desenvolver em cavalos de todas as idades, inclusive nos jovens, por meio de diferentes mecanismos.

A fragmentação osteocondral resultante da avulsão de um ligamento é encontrada nas enteses, seus locais de inserção. Forças de tensão sobre o esqueleto jovem, nestes locais,

podem ser responsáveis por dano biomecanicamente induzido. Elas podem resultar na separação de um fragmento osteocondral ou na avulsão da cartilagem de crescimento, que pode, subsequentemente, ossificar-se ou crescer. Neste caso, contudo, as forças não são exercidas sobre a placa óssea subcondral, como nos casos anteriores, mas sobre o osso epifisário ou até metafisário, no qual o respectivo ligamento se insere, a alguma distância da margem articular. À exceção de grandes fragmentos que se estendam até a superfície articular, esta forma de insulto biomecânico não vai afetar diretamente o processo de ossificação endocondral sob a superfície articular e, portanto, não resultará em lesões de OC verdadeiras. Não obstante, este tipo de injúria pode resultar na formação de fragmentos osteocondrais caso haja uma fratura, como é o caso dos fragmentos osteocondrais palmares ou plantares, comumente vistos nas eminências palmares ou plantares da falange proximal, no sítio de inserção dos ligamentos sesamoideos curtos e oblíquos e daqueles encontrados em situação peri articular, no interior do ligamento colateral de algumas articulações como o curvilhão e o boleto (DENOIX et al., 2013).

2.2.2 As lesões osteocondrais juvenis

As doenças do desenvolvimento ortopédico no equino (DODs) são uma causa frequente de dor e claudicação, das quais a OC é parte. A prevalência da OCD nos equinos varia de acordo com as raças e articulações afetadas, sendo reportada entre 20 e 80% (KROLL; HERTSCH; HÖPPNER 2001; KANE et al., 2003; LEPEULE et al., 2013). Esta grande variação nos dados pode ser explicada pelo caráter dinâmico da OCD, pela influência da idade do animal quando da realização dos estudos radiográficos, pelo número de articulações radiografadas durante um exame e de quais achados são caracterizados como OC. Até que todas estas variáveis estejam devidamente padronizadas, a comparação entre populações e a unificação dos dados ficará prejudicada (VAN WEEREN; JEFFCOTT, 2013).

Infelizmente, os termos OC e OCD têm sido utilizados indiscriminadamente nos equinos, descrevendo uma variedade de lesões do esqueleto de animais jovens e maduros, sem respeitar diferenças em sua etiologia, patogenia e manifestações clínicas (POOL, 1993). Incongruências na definição das manifestações levam a resultados confusos sobre a prevalência da enfermidade (DENOIX et al., 2013). Lesões no aspecto caudal da superfície articular proximal do úmero, no aspecto medial do côndilo do úmero, na crista lateral da

tróclea do fêmur, no côndilo medial do fêmur, na crista intermédia distal da tíbia, na crista lateral da tróclea do talus e no aspecto dorsal e distal do metacarpo/metatarso são apropriadamente classificadas como OCDs (POOL, 1993).

Outro fator complicador no estudo da OCD é o caráter extremamente dinâmico da enfermidade em equinos muito jovens. Muitas das lesões inicialmente observadas desaparecem completamente nos meses seguintes, e fragmentos radiograficamente detectáveis acabam por ser reintegrados à matriz óssea. Este é um processo comum a todas as articulações afetadas, mas o período de aparecimento e desaparecimento das lesões varia entre elas. Na articulação tíbio-társica, os defeitos são visíveis já no primeiro mês e tendem a desaparecer durante os cinco meses de vida seguintes. Ocasionalmente, uma nova lesão pode se desenvolver neste período, após o qual, a situação tende a permanecer estável. Em contraste, na articulação fêmur-tíbio- patelar, não são observadas anormalidades nos primeiros meses de vida. Elas surgem em torno do terceiro mês, com pico de aparecimento em torno do sexto mês, tendendo a desaparecer por volta do 8º ou 9º mês de vida, período após o qual a situação se mantém estável. Além de evidenciarem a dificuldade de realizar um estudo epidemiológico fidedigno da OC, estas observações demonstram a existência de um processo de reparação, além do de destruição, ocorrendo concomitante nas articulações acometidas por distúrbios da ossificação endocondral (VAN WEEREN, 2006).

Adicionada ao caráter dinâmico da afecção, a multiplicidade de locais onde ela potencialmente se instala introduz grande variabilidade no resultado das avaliações radiográficas, na dependência da idade com a qual os animais são examinados, e de quantas articulações são examinadas. Comumente, múltiplas articulações encontram-se acometidas em um único indivíduo e um estudo radiológico incompleto pode subestimar a incidência da enfermidade naquele paciente ou em uma população em estudo (VAN WEEREN; JEFFCOTT, 2013).

Uma extensa lista de similaridades existe entre a OC que afeta homens e animais, sugerindo o compartilhamento de uma patogenia comum entre as diferentes espécies. Ela inclui similaridades nos locais de predileção para a instalação das lesões, na apresentação clínica, nas alterações observáveis aos exames de imagem radiográfico e de ressonância magnética e na apresentação final das lesões, ao exame histológico. O envolvimento bilateral clinicamente aparente também é comum nas diferentes espécies, tanto quanto o achado de lesões assintomáticas em indivíduos jovens, e que não evoluem para manifestação clínica, sugerindo que a maioria destas lesões sofra completa cicatrização (MCCOY et al., 2013). Apenas a distribuição de sexos difere da observada nos pacientes humanos. Equinos machos e

fêmeas são indistintamente afetados pela OC, enquanto as mulheres são mais frequentemente acometidas que os homens (HOPPE, 1984; PHILIPSSON et al., 1993; LEPEULE et al., 2009; LEPEULE et al., 2013). A causa para esta diferença na distribuição da OC nos humanos não é conhecida.

Em relação ao que se verifica nos pacientes humanos, o reconhecimento da OC nos equinos é bastante precoce. Mesmo quando as lesões são assintomáticas, sua identificação em estágios mais iniciais é favorecida por práticas sedimentadas no meio equestre. São exemplos o rastreamento radiológico que precede os leilões de venda de animais de menos de dois anos de idade, as provas de desempenho atlético de animais jovens e o início do treinamento destes animais. A identificação das lesões osteocondrais pode ser mais tardia em raças menos precoces ou naqueles indivíduos onde o início do treinamento físico é postergado. Nos seres humanos é muito provável que mesmo as alterações identificadas apenas na vida adulta tenham origem na infância, antes do fechamento da placa fisária (SCHENCK; GOODNIGHT, 1996). Sua manifestação fica condicionada à incidência de maiores sobrecargas sobre as articulações afetadas, o que ocorre mais frequentemente com a aproximação da maturidade esquelética. A ossificação ou fechamento das cartilagens fisárias e epifisárias são a evidência desta maturidade em todas as espécies, e é alcançada muito mais rapidamente nos animais, favorecendo o diagnóstico relativamente mais precoce, em relação ao que ocorre no homem.

2.2.3 A cartilagem de crescimento sadia

É importante notar que a matriz cartilaginosa da placa de crescimento é bastante distinta daquela da cartilagem articular suprajacente. Apesar da identidade macroscópica, há uma distinção histológica importante entre elas. Enquanto a cartilagem articular é avascular, existem vasos que invadem a cartilagem da placa de crescimento, a partir do plexo pericondral. Estes vasos (artérias, vênulas e capilares) correm no interior de canais, denominados de canais da cartilagem, que também estão presentes na cartilagem fisária, a qual eles penetram pela extremidade epifisária (SHAPIRO, 1998). Eles formam um arranjo complexo, onde a arteríola se ramifica numa rede de capilares semelhantes à rede de capilares glomerulares do rim. Anastomoses entre os canais não são observadas na cartilagem de crescimento. Contudo, canais da cartilagem podem atravessar o osso subjacente, onde formam anastomoses com vasos da medula óssea. Esses canais têm como função nutrir os condrócitos

situados em zonas mais profundas, além do alcance da difusão de nutrientes que ocorre a partir do líquido sinovial (WILSMAN; VAN SICKLE, 1972; YAMAGUCHI et al., 1990), ajudar na formação e manutenção dos centros de ossificação secundários (VISCO et al., 1990; YAMAGUCHI et al., 1990) e suprir a cartilagem e o osso com células mesenquimais (WILSMAN; VAN SICKLE, 1970).

No decorrer do amadurecimento ósseo e cartilágneo dos potros, estes canais da cartilagem desaparecem; isto ocorre por volta dos sete meses de idade e este processo de regressão fisiológica é conhecido como condrificação (HAINES, 1974). O termo implica numa transformação do canal, na qual os vasos regridem e as células mesenquimais são convertidas em condrócitos proliferativos e produtores de matriz, que obliteram o lúmen do canal pré-existente. Este processo ocorre sem estar associado à necrose da cartilagem de crescimento epifisária adjacente. Quando o indivíduo atinge a vida adulta, a cartilagem de crescimento epifiseal é substituída por osso e nenhum canal da cartilagem permanece.

Fisiologicamente, conforme a ossificação endocondral progride e a linha de ossificação avança em direção a superfície da cartilagem articular, o suprimento sanguíneo arterial para a maioria dos vasos contidos nos canais da cartilagem deve mudar das arteríolas que se originam no pericôndrio e periósteo para arteríolas que se originam da cavidade medular, do centro secundário de ossificação, e que cruzam a linha de ossificação. Esta transferência permite um constante suprimento de nutrientes ao complexo de cartilagem articular-epifisária (AECC), que se torna cada vez mais delgado, e envolve a formação de anastomoses entre vasos da cartilagem epifiseal e vasos da linha de ossificação que avança. Estudos demonstram, contudo, que este período de transição do suprimento sanguíneo é propenso a falhas, geralmente resultantes da instabilidade física das anastomoses neoformadas, de efeitos locais de fatores de crescimento sobre os vasos presentes na linha de ossificação, ou de suporte mecânico inadequado para estes vasos em desenvolvimento, por parte do tecido que os circunda. Ainda, o impacto de forças mecânicas pode ser especialmente alto na junção osteocondral, na transição entre os dois tipos distintos de tecido. Dada a ausência de anastomoses entre os vasos contidos no interior dos canais da cartilagem, a falha neste processo de transição de suprimento sanguíneo resulta em necrose avascular de uma área bem delimitada de cartilagem de crescimento epifiseal. A falência da vascularização e mineralização da cartilagem necrótica levam à parada do processo de ossificação endocondral, característica da OC (CARLSON; CULLINS; MEUTEN, 1995; YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007; MCCOY et al., 2013; VAN WEEREN; JEFFCOTT, 2013).

2.2.4 A cartilagem de crescimento na OC

Na década de 90, houve muita controvérsia sobre quais lesões seriam realmente características da OC, levando à necessidade de uma descrição histopatológica detalhada dos eventos sediados na cartilagem de crescimento enferma, para propiciar a devida padronização. Carlson, Cullins e Meuten (1995) realizaram exames macroscópicos, microradiográficos e histológicos de três sítios de predileção de instalação de OC e verificaram que os canais vasculares contendo vasos patentes estavam presentes em potros com menos de três semanas, mas ausentes aos 7 meses de vida, nestes locais. Verificaram também que todas as lesões encontradas neste grupo, cuja faixa etária variava de três semanas a cinco meses de idade, estavam associadas à presença de vasos necróticos nos canais da cartilagem. As lesões encontradas nos potros com mais de sete meses de idade apresentavam extenso envolvimento do osso subcondral e medula óssea e foram consideradas crônicas. Estes autores concluíram que as lesões osteocondrais se desenvolviam anteriormente ao sétimo mês de vida e que a necrose isquêmica da cartilagem estava envolvida na afecção. Shingleton et al. (1997) examinaram o AECC de cavalos normais e cavalos acometidos por OC, em vários locais. Estes autores verificaram que canais de cartilagem estavam presentes a partir de 130 dias de gestação e ausentes em potros normais aos seis meses de idade. Observaram, ainda, que em cinco dos seis animais acometidos por OC estudados, os canais estavam associados com retenção da cartilagem, e que nestas regiões os canais continham vasos patentes, rodeados por condrócitos anormalmente pequenos para sua localização no complexo. Neste estudo, os condrócitos não sofreram necrose mas não se hipertrofiaram, caracterizando a falência do processo de ossificação endocondral. Estes autores também sugeriram que a patência anormalmente prolongada dos vasos no interior dos canais de cartilagem pudesse expor a cartilagem de crescimento situada nas vizinhanças deste canal a desequilíbrios hormonais sistêmicos, como por exemplo, aqueles advindos de dietas ricas em energia. Olstad et al. (2008) verificaram a falência de vasos nos canais da cartilagem, na área onde cruzam a linha de ossificação, com consequências para os condrócitos dele dependentes, em potros de zero a sete semanas de idade.

Não obstante as evidências contundentes de falência vascular, mecanismos moleculares também contribuem para a patogenia da OC na cartilagem de crescimento. O componente colágeno da MEC é o primariamente afetado. Em estágios iniciais de lesão, o

colágeno total apresentou-se diminuído, tanto na cartilagem como na ossatura subcondral, em potros de 5 a 11 meses de idade acometidos por OC. O conteúdo de colágeno manteve-se diminuído na cartilagem nas fases central e terminal de evolução das lesões osteocondrais, mas normalizou-se na ossatura subcondral. Na cartilagem, o conteúdo de proteoglicanos apresentou-se diminuído na fase terminal das lesões, tanto no grupo hígido como no grupo acometido por OC (VAN DE LEST et al., 2004). O aumento do metabolismo e da degradação do colágeno é evidenciado pela presença do propeptídeo de colágeno tipo II (CP II) no líquido sinovial, além de através de alterações estruturais evidentes em suas moléculas. A alta taxa de reciclagem do colágeno acompanha um aumento do metabolismo dos condrócitos na cartilagem afetada pela OC, em comparação com locais não afetados. Concomitantemente, MMPs e outras enzimas proteolíticas encontram-se ativadas neste cenário (VAN WEEREN, 2006). O aumento da síntese de colágeno tipo II em animais jovens acometidos por OC parece ser característico e, apesar da taxa aumentada de degradação e da redução do conteúdo de colágeno reportadas, os resultados não são consistentes entre estudos, ainda necessitando de posterior confirmação.

Dada a importância do colágeno para as propriedades biomecânicas do complexo articular epifisário da cartilagem, alterações estruturais ou metabólicas em sua rede de fibras podem tornar a cartilagem juvenil propensa aos efeitos nocivos de forças de uso e desgaste, particularmente àqueles das forças de cisalhamento. O padrão consistente de síntese de colágeno aumentada na análise de biomarcadores da OC iniciante pode refletir a existência de processos reparativos, mas é surpreendente que achados metabólicos similares não sejam reportados para a outra molécula fundamental constituinte da MEC, o proteoglicano. A clara disparidade entre as anormalidades do metabolismo do colágeno nos estágios iniciais da OC e a ausência de perturbação no metabolismo dos proteoglicanos, corrobora para a evidência de participação das alterações no colágeno tipo II nestes eventos precoces da OC.

A quantidade de colágeno tipo II presente na cartilagem ou seu metabolismo podem ser determinados geneticamente, ou por diferenças no manejo nutricional. Especula-se que um crescimento excessivamente rápido induzido por dietas muito ricas ou fatores genéticos, por exemplo, poderia levar à síntese de uma MEC não suficientemente forte para suportar a integridade dos canais da cartilagem, na cartilagem de crescimento. Adicionalmente, o rápido desenvolvimento articular poderia ultrapassar a velocidade de maturação do colágeno, à medida que é necessário um certo tempo para que ocorram as ligações entre suas moléculas. São estas ligações que formarão as fibrilas e estabilizarão o arranjo característico das moléculas de colágeno, em grande parte responsável por sua força tênsil.

Uma matriz contendo colágeno do tipo II alterado poderia tornar os vasos nela contidos mais susceptíveis a injúria em locais de maior concentração de estresses biomecânicos. O remodelamento fisiológico do colágeno na junção osteocondral, incluindo a extensa proteólise, pode alterar as propriedades biomecânicas neste local, predispondo os vasos dos canais da cartilagem à injúria, mas esta hipótese ainda aguarda confirmação. Da mesma forma, especula-se que o aumento da degradação de colágeno do tipo II e a redução do conteúdo total de colágeno encontrados por alguns investigadores possam ser secundários a processos degenerativos na cartilagem necrótica das lesões. Eventos traumáticos poderiam amplificar a atividade colagenolítica, e tanto o trauma isolado quanto o trauma repetitivo poderiam desempenhar um papel na gênese da OC (LAVERTY; GIRARD, 2013).

2.2.5 A patogenia da OC

Em relação à patogenia da OC, as principais linhas de pensamento se dividem entre as que sugerem mecanismos subjacentes de naturezas diversas, incluindo inflamação, osteonecrose, anormalidades da matriz extracelular (MEC) e fragilidade óssea, como responsáveis pelas lesões osteocondrais juvenis. Todos os mecanismos propostos por estas linhas de pesquisa apresentaram falhas. Eles não tiveram comprovação histológica ou não puderam ser reproduzidos experimentalmente, com exceção daquele que imputava à interrupção do suprimento sanguíneo para os canais da cartilagem no interior da cartilagem epifisária, o aparecimento das áreas focais de condronecrose, e a não concretização do processo de ossificação endocondral (MCCOY et al., 2013). Mais especificamente, a maioria destes mecanismos falhou em explicar a natureza focal da OC, a existência de locais de predileção para instalação das lesões (que diferem entre espécies) e o fato das lesões tenderem a ser bilateralmente simétricas (YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007). Tanto as propostas de condrodisplasia primária (OLSSON; REILAND, 1978) como as de fragilidade óssea e cartilágnea (HURTIG et al., 1993) implicam em mecanismos que afetariam globalmente o esqueleto, determinando fraqueza generalizada da cartilagem e do osso, o que não se observa na OC.

As áreas de condronecrose, por outro lado, estão intimamente relacionadas com vasos necróticos e não perfundidos no interior de canais de cartilagem. Estas lesões ocorrem em locais previsíveis e associados à idade dos animais, estando diretamente relacionadas à perda

de suprimento sanguíneo, por sua vez, também associada à idade dos animais. Elas podem ser observadas em modelos experimentais e em casos de ocorrência espontânea da enfermidade (YTREHUS et al., 2004a,b; OLSTAD et al., 2008).

2.2.6 O Processo de Ossificação Endocondral

Durante o período de desenvolvimento ósseo, existem dois locais de cartilagem especializada em crescimento, nas porções terminais dos ossos longos. O primeiro é a fise, ou placa de crescimento fisária, que está presente de cada lado do centro primário de ossificação e é responsável pelo crescimento longitudinal dos ossos. O segundo é a placa de cartilagem epifisária presente entre os centros secundários de ossificação e a cartilagem articular que se encontra sobrejacente, formando uma unidade conhecida como complexo de cartilagem articular – epifiseal (AECC). Esta unidade é responsável pela forma das extremidades dos ossos longos e pelo crescimento radial. Nela, a camada articular permanece por toda a vida adulta e não contribui para o crescimento. Na placa fisária, a cartilagem de crescimento é substituída por osso através de um processo sequencial de proliferação celular, síntese de matriz extracelular (MEC), hipertrofia celular, mineralização de matriz e invasão vascular, conhecido como ossificação endocondral (LEFEBVRE; SMITS, 2005). A vantagem deste processo é que o crescimento ocorre pela contínua adição de cartilagem e subsequente reposição por osso, de forma que o indivíduo é capaz de suportar peso à medida que o crescimento ocorre.

Os condrócitos, tanto na cartilagem de crescimento fisária como epifisária, estão organizados em quatro zonas distintas, que refletem as mudanças que ocorrem durante o processo de ossificação endocondral. A primeira, a zona de repouso, contém condrócitos que se dividem raramente. Eles funcionam como precursores daqueles da segunda zona, a zona proliferativa, na qual as células se dividem rapidamente. Na cartilagem de crescimento fisária os condrócitos em proliferação formam colunas facilmente identificáveis, enquanto na cartilagem de crescimento epifisária (AECC) esta organização em colunas é menos óbvia, com as células formando aglomerados. Na terceira zona, a zona hipertrófica, condrócitos terminalmente diferenciados aumentam significativamente de volume, secretando e mantendo uma matriz altamente especializada, cuja função é promover a calcificação da cartilagem, que servirá como molde para a formação do osso, pelos osteoblastos. Na zona de calcificação, a

quarta, os osteoclastos removem os septos transversos, permitindo a invasão de alças vasculares e células osteoprogenitoras nas lacunas deixadas pelos condrócitos hipertróficos terminais. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), produzido pelos condrócitos hipertróficos, parece ser o fator necessário e responsável pelo crescimento de vasos para o interior da placa de crescimento (GERBER et al., 1999). A invasão da cartilagem por vasos sanguíneos é necessária para a conclusão da ossificação endocondral, conforme ilustrado pelo fato de que fatores genéticos, mecânicos, bioquímicos que provoquem perturbação da angiogênese resultarão em engrossamento da placa de crescimento epifiseal devido à expansão da zona hipertrófica (YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007).

No AECC, os condrócitos mais próximos da superfície articular produzem a cartilagem articular. Condrócitos situados nas proximidades das epífises participam da ossificação endocondral da mesma forma como ocorre na fise. As cartilagens de crescimento fisária e da AECC são ambas susceptíveis a OC (DOUGLAS, 2003).

Já na linha de ossificação, os osteoblastos englobam as superfícies dos septos longitudinais remanescentes, que aparecem nos cortes histológicos como espículas de cartilagem calcificada, e depositam tecido ósseo sobre eles, formando a chamada esponjosa primária, constituída pela cartilagem calcificada, pela trama óssea e pelo osso lamelar. Este último, substitui tanto a cartilagem calcificada como o tecido ósseo depois da remoção condroclástica e do remodelamento osteoclástico, constituindo a zona mineralizada. A taxa de progresso da diferenciação e do crescimento, a direção do processo no espaço tridimensional e o momento de sua conclusão parecem ser afetados por fatores genéticos, nutricionais, metabólicos (incluindo hormônios) e mecânicos. Estímulos provenientes de forças mecânicas e de tensão aceleram o crescimento e a ossificação da cartilagem, enquanto cargas compressivas os inibem (YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007).

A proliferação dos condrócitos na placa de crescimento está sob controle de um mecanismo de retroalimentação dependente da localização temporal e espacial, que envolve três moléculas sinalizadoras sintetizadas pelos condrócitos. São elas o peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide (PTHrP), o Indian hedgehog (Ihh) e o TGF- β . Este sistema regula a taxa na qual os condrócitos deixam a zona proliferativa e irreversivelmente tornam-se células hipertróficas, terminalmente diferenciadas. O PTHrP, um hormônio com homologia ao hormônio da paratireoide, é sintetizado e secretado pelas células peri articulares pericondriais e pelos condrócitos em desenvolvimento avançado. Ele facilita a contínua proliferação de condrócitos na placa de crescimento e inibe sua hipertrofia (JÜPPNER, 2000). Assim, um *pool* de células proliferativas é mantido e a diferenciação prematura em condrócitos pré-

hipertrofia e hipertrofia é evitada (GOLDRING; TSUCHIMUCHI; IJIRI, 2006). O Ihh é uma molécula secretada pelos condrócitos pré-hipertrofia e hipertrofia, que promove a proliferação dos condrócitos e fornece um sinal para a manutenção do PTHrP nas extremidades do osso em desenvolvimento. Ao inibir a maturação dos condrócitos, o PTHrP modula a ação do Ihh nas células próximas das extremidades ósseas. Finalmente, o TGF- β é produzido pelas células pericondriais e peri articulares para aumentar a síntese de PTHrP. Ele também age diretamente sobre os condrócitos, inibindo sua hipertrofia. Apesar do TGF- β inibir a hipertrofia dos condrócitos, ele mostrou-se capaz de induzir condrócitos pós-proliferativos a entrar em diferenciação precocemente e a induzir morte não fisiológica (não apoptótica) destas células.

Ainda que o sistema PTHrP-Ihh-TGF- β seja o regulador primário da proliferação celular na placa de crescimento, ele parece ser modulado por outras moléculas sinalizadores sistêmicas e locais (KRONENBERG, 2003; TRACY BALLOCK; O'KEEFE, 2003; PROVOT; SCHIPANI, 2005).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina tipo I e II (IGF-I e IGF-II) mostraram ser condrogênicos em culturas de condrócitos equinos, enquanto a insulina apresentou efeito preventivo sobre a morte celular de condrócitos, *in vivo* (HENSON et al., 1997). Alterações nas concentrações plasmáticas do IGF-1 mostraram estar relacionadas ao aparecimento de OC e OA em vários estudos (LEJEUNE et al., 2007), e a insulina está também relacionada a atividade metabólica do osso (DAVICCO et al., 1994). Cavalos com escores radiológicos mais elevados para OC apresentaram níveis significativamente inferiores de IGF-1 (SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTE; MOL; BARNEVELD, 1999), assim como o fizeram cavalos que sofriam de osteoartropatia degenerativa juvenil (LEJEUNE et al., 2007) e um grupo de cavalos puro sangue ingleses de dois anos de idade, submetido à exercícios em esteira (JACKSON et al., 2003). Contudo diferenças no IGF-1 sérico não puderam ser confirmadas observando-se somente os animais acometidos por OC, ou quando eles foram comparados com a população geral.

As BMPs são outro grupo de fatores de produção local que, além dos IGFs, podem induzir o crescimento do esqueleto, independentemente do Ihh. Elas são membros da superfamília TGF- β e a sinalização por estas proteínas estimula a proliferação dos condrócitos na cartilagem de crescimento, iniciando a condrogênese. A sinalização pelas BMPs também induz a expressão do Ihh, mas seus efeitos sobre a proliferação e hipertrofia dos condrócitos são independentes do Ihh. Da mesma forma o Ihh induz a expressão de várias BMPs, mas os efeitos do Ihh na proliferação dos condrócitos são independentes da sinalização das BMPs.

A presença de componentes da matriz extracelular (colágenos e proteoglicanas) também exerce efeitos mediados por receptores específicos, sobre o metabolismo celular (MACKIE et al., 2008).

O aumento de volume celular que ocorre nos condrócitos, à medida que eles sofrem hipertrofia, requer uma degradação da MEC na vizinhança destas células. A invasão da linha de ossificação requer uma degradação ainda mais extensa, mesmo que seletiva. As enzimas proteolíticas responsáveis por estes eventos de degradação são a MMP-13 e a MMP- 9, além das agrecanases. A expressão da MMP-13 pelos condrócitos é um pré-requisito para a invasão da cartilagem de crescimento por vasos sanguíneos, osteoclastos e células osteogênicas. Estas células são incapazes de penetrar as lacunas deixadas pela morte dos condrócitos, até que os septos transversais de matriz cartilaginosa que os rodeiam tenham sido degradados pela MMP-13. A MMP-13 deixa os septos longitudinais intactos, mas permite a invasão das células presentes na linha de ossificação.

As áreas da cartilagem de crescimento que falham em sofrer calcificação da matriz ou invasão vascular, não se convertem em osso, e são identificáveis em cortes macroscópicos como zonas localizadas e de cartilagem bastante espessada, acompanhadas de uma junção osteocondral irregular. Em casos mais graves, a cartilagem que permanece é macia e avermelhada, e a medula óssea subjacente é edematosa e hiperêmica. Contudo, antes de ser macroscopicamente visível, a lesão típica da OC é caracterizada, histologicamente, por uma área focal de necrose confinada à cartilagem de crescimento e que não envolve a cartilagem articular suprajacente, nem o osso subcondral subjacente. Depois que uma fissura se forma na área de cartilagem necrótica e se estende através da cartilagem articular, com a formação de um flap ou um fragmento solto, a lesão é denominada de OCD. De fato, as lesões de OCD são caracterizadas por áreas de condronecrose, intimamente associadas a vasos necróticos e não perfundidos nos canais da cartilagem. Elas podem ser caracterizadas como fruto de uma necrose isquêmica da cartilagem de crescimento, iniciada por uma necrose dos vasos dos canais da cartilagem (YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007). Contudo, como vimos anteriormente, estas lesões não são as únicas formas de manifestação das lesões osteocondrais juvenis (DENOIX et al., 2013).

2.2.7 A OC como enfermidade multifatorial

Vários fatores envolvidos na etiologia da OC justificam sua definição como enfermidade multifatorial, e explicam a dificuldade em se atribuir a um único fator desencadeante a multiplicidade de aspectos que a compõem. Entre estes fatores destacam-se a hereditariedade, características anatômicas, trauma, fatores nutricionais e o rápido crescimento.

Em relação à hereditariedade, diferenças entre as prevalências em cavalos de diferentes raças e linhagens indicam fortemente que há um componente hereditário para a OC (GRØNDAHL; DOLVIK, 1993). Pôneis e cavalos ferais, por exemplo, apresentam prevalência extremamente baixa de leões osteocondrais juvenis (VALENTINO et al., 1999; VOUTE et al., 2011). Todos os estudos na espécie equina indicam que a OC é herdada como traços poligenéticos (PHILIPSSON, 1996). Exatamente quais traços são predisponentes para a doença e a natureza da interação entre fatores ambientais e genéticos ainda não foram determinados. As estimativas de herdabilidade para OC em cavalos e porcos varia de 0.14 a 0.52, dependendo da localização e da definição atribuída à lesão. Assim, entre 14% e 52% do risco da doença ocorrer, pode ser atribuído a fatores genéticos, nestas espécies. Grøndahl e Dolvik (1993) observaram que mais de 70% dos potros filhos de um mesmo garanhão portador de OC eram portadores da afecção, enquanto no estudo de Philipsson et al. (1993) produtos de garanhões afetados mostraram ter probabilidade duas vezes maior de desenvolver OC, que os potros de garanhões não afetados. Estudos recentes comprovam a associação da OC com determinadas raças, especialmente para os cavalos de sangue quente, quando comparados aos puro-sangues ou aos cavalos franceses de trote (LEPEULE et al., 2013).

O recente mapeamento do genoma equino favoreceu a realização de pesquisas destinadas a determinar quantitativamente os sítios para traços genéticos em equinos portadores de OC, ou provenientes de famílias com alta incidência da enfermidade, auxiliando também a verificar sua contribuição para a expressão fenotípica da OC (DIERKS et al., 2007). Estudos demonstram que os fatores genéticos são os principais e mais consistentemente implicados no desenvolvimento da OC. As OCs da articulação tíbio-társica parecem ser as mais promissoras para seleção genômica, uma vez que possuem herdabilidade de 0.3-0.4, na maioria das populações equinas. Para as OCs metacapo/metatarso falangeanas e fêmur-tíbio-patelares as respostas genéticas esperadas são menores, deixando para os fatores ambientais um papel de maior relevância. A herdabilidade para a OC fêmur-tíbio-patelar foi estimada em 0.02, em recente estudo. Estes resultados indicam que uma resposta suficientemente alta pode

ser alcançada através de programas de seleção. Atualmente, alguns países europeus realizam uma pesquisa radiográfica detalhada em candidatos a reprodutores, para rastreamento da OC. Contudo, conforme mencionado anteriormente é necessário que estes estudos radiográficos sejam padronizados para o efetivo rastreamento da OC e devem, ainda, ser estendidos às éguas destinadas à reprodução (DISTL, 2013).

A correlação genética entre os locais mais frequentemente acometidos por lesões mostrou-se baixa em recente estudo. Este achado juntamente com a alta herdabilidade para lesões específicas, não para articulações como um todo, questiona o conceito de uma base genética comum para todas as manifestações de OC. É provável que existam particularidades na susceptibilidade de uma determinada articulação ou sítio articular para o desenvolvimento da OC. Esta observação estaria de acordo com estudos de genética molecular, onde genes candidatos para OC parecem variar de acordo com as articulações, com a localização da lesão na articulação e com a manifestação da OC (achatamento, fragmentação, cistos) (DISTL, 2013)

Deve ser ressaltado, ainda, que vários fatores etiológicos a serem discutidos a seguir são, de alguma forma, influenciados pela genética. Por exemplo, a conformação de um indivíduo é capaz de alterar sua biomecânica, e muitas características de conformação são geneticamente determinadas. A taxa de crescimento é determinada pela nutrição e por fatores genéticos, enquanto a resposta hormonal à dietas ricas em carboidratos também pode ser influenciada pela genética (VAN WEEREN, 2006).

Características anatômicas parecem ser importantes na etiologia da OC em humanos e cães, mas estudos em cavalos são escassos. Contudo, as alterações anatômicas estão relacionadas, pelo menos até certo ponto, a fatores genéticos, dificultando a determinação da precisa contribuição de cada fator.

O trauma tem sido um dos fatores mais frequentemente propostos para a etiologia da OC, em todas as espécies (BOHNDORF, 1998; EKMAN; CARLSON, 1998). Em suporte à etiologia traumática, locais de predileção para instalação da OC parecem ser áreas de incidência de maior estresse biomecânico. Sugere-se que o papel do trauma na patogenia da OC esteja na dependência do estágio da doença. Apesar de estar envolvido na conversão de uma lesão assintomática para uma lesão do tipo dissecante, a severidade do trauma necessária para causar tais efeitos é geralmente mínima. De fato, o aparecimento de sinais clínicos na maioria dos casos de OC é precipitado por traumas menores, insuficientemente severos para desencadear a enfermidade em uma articulação normal e não há evidências de que um macro

trauma agudo esteja envolvido na iniciação de lesões primárias de OC (YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007).

A prática de exercício pode ser vista como um conjunto de influências biomecânicas traumáticas sobre o esqueleto em desenvolvimento, uma vez que ela propicia um acúmulo de cargas sobre as articulações. No entanto, esta associação é menos óbvia do que aparenta ser, e vários estudos que procuraram associar a prática de exercícios à incidência de OC apresentaram resultados conflitantes. Em um deles, foi observado que um grupo de equinos jovens, de cinco a onze meses de idade, submetido a exercícios de galope, tendeu a apresentar menor severidade das lesões de OC, do que as observadas nos grupos controles (repouso e pasto) (VAN WEEREN; BARNEVELD, 1999). Estes autores demonstraram que o exercício não previne e nem causa a formação de lesões, podendo ter um efeito benéfico nos processos regeneradores articulares. Se por um lado a restrição de exercícios afetou negativamente as lesões osteocondrais em potros, o exercício indiscriminado, em grandes piquetes, esteve associado com um maior risco de desenvolver lesões osteocondrais nestes indivíduos jovens (LEPEULE et al., 2013). Exercícios adicionais, além daquele realizado pelos potros em liberdade nos piquetes, podem melhorar a viabilidade dos condrócitos e estimular o processo de maturação fisiológica da MEC. Contudo o exercício não deve ser excessivo, pois existem fortes indícios de que atividades físicas intensas e/ou prolongadas podem ser prejudiciais, e ter efeitos negativos a longo prazo (VAN WEEREN et al., 2008). Estes achados, apesar de contraditórios, estão de acordo com conceitos já estabelecidos em relação ao desenvolvimento musculoesquelético e as influências por ele sofridas durante o processo de desenvolvimento (VAN WEEREN; BRAMA, 2003).

Fatores dietéticos foram associados à presença de lesões articulares osteocondrais em equinos, como, por exemplo, a deficiência em cobre (KNIGHT et al., 1990; HURTIG et al., 1993). As lesões são causadas por deficiência primária de cobre ou pela exposição a fatores que inibam o metabolismo ou a absorção de cobre, tal como zinco, cádmio ou sulfatos inorgânicos. Foi proposto que a suplementação com cobre a éguas no final da gestação teria um efeito protetor nos potros, em relação ao desenvolvimento da OC (PEARCE et al., 1998). Contudo, os níveis de cobre no fígado de potros ou a frequência de irregularidades cartilagíneas não foram alterados por este tratamento (GEE et al., 2007). As lesões associadas à deficiências séricas ou hepáticas de cobre são tipicamente severas, extensas e envolvem várias articulações, além da deficiência de cobre ser uma doença sistêmica. É provável que existam períodos e sítios de maior susceptibilidade, durante os quais a existência de fatores nutricionais passe a desempenhar papel relevante nas manifestações da OC, mas estes variam

entre espécies e em relação a sua localização. Ainda não foi demonstrada uma relação clara de causa e efeito entre nutrição e OC (MCCOY et al., 2013).

O cálcio parece ter pouco ou nenhum efeito sobre a ocorrência da OC, mas níveis de fósforo aumentados levaram a um aumento do número de lesões, imputado ao enfraquecimento da placa de osso subcondral, resultante da osteoporose (SAVAGE; MCCARTHY; JEFFCOTT, 1993a).

Nos equinos, foi proposto que uma dieta rica em energia participasse da etiologia da OC, através da forte resposta hiperinsulinêmica pós prandial, provocada pela alta disponibilidade de carboidratos solúveis. Um estudo onde potros foram divididos em três grupos, um recebendo alimentação balanceada, outro recebendo dieta rica em proteínas e outro recebendo dieta rica em energia, revelou a presença de lesões macroscópicas compatíveis com OC em 8%, 17% e 92% dos potros, respectivamente. A confirmação histológica ocorreu em 17% dos potros do grupo controle, em 67% dos potros que receberam dieta rica em proteínas e em todos os potros que receberam a dieta rica em energia. Não houve diferença significativa entre os potros que consumiram a dieta controle e a dieta rica em proteína. Contudo, os potros que receberam a dieta rica em energia apresentaram lesões do AECC e das cartilagens de crescimento, e a diferença na incidência da OC entre estes potros e os do grupo controle foi significativa (SAVAGE; MCCARTHY; JEFFCOTT, 1993b). A insulina e o IGF-1 e o IGF-2 têm efeito direto sobre a ossificação endocondral. Adicionalmente, a insulina estimula a rápida remoção dos hormônios tireoideanos T3 e T4 da circulação, hormônios que estão envolvidos nos estágios finais da diferenciação dos condrócitos e na invasão da cartilagem de crescimento pelos vasos sanguíneos (VAN WEEREN, 2006). Assim, um aumento nas concentrações de insulina e uma diminuição nas concentrações circulantes de tiroxina, desencadeadas por uma dieta rica em energia, poderiam desencadear uma falência na maturação e hipertrofia dos condrócitos, especialmente daqueles situados em volta dos canais da cartilagem, aos quais estes hormônios teriam maior acesso (SHINGLETON et al., 1997; JEFFCOTT; HENSON, 1998). De acordo com esta hipótese, condrócitos sob a influência de concentrações aumentadas de insulina e de concentrações reduzidas de tiroxina, persistiriam como núcleos cartilagíneos; quando submetidos a forças biomecânicas na zona de transição entre cartilagem e osso, estes núcleos se tornariam necróticos. No entanto, estas hipóteses são refutadas pela morfologia das lesões iniciais da OC articular, caracterizadas por áreas claramente demarcadas de necrose de condrócitos na cartilagem epifisária. (CARLSON; CULLINS; MEUTEN, 1995). A formação dos núcleos de

cartilagem é um evento subsequente, causado pela resistência da cartilagem necrótica ao processo de mineralização e vascularização.

A teoria que liga o desequilíbrio nutricional ao aparecimento das lesões osteocondrais juvenis falha ao não considerar e explicar o fato de que as lesões ocorrem focalmente, em locais e predileção, e de forma não generalizada. Desta forma, a maior parte da produção científica dedicada ao tema, não só nos equinos mas em todas as espécies, não demonstra a participação direta do crescimento acelerado e do desequilíbrio nutricional na etiologia da OC (YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007). Estes fatores têm participação no desenvolvimento das lesões características da OC, mas certamente não são os únicos implicados em sua etiologia (VAN WEEREN, 2006).

Lepeule et al. (2013) observaram grande influência da taxa de crescimento na prevalência da OC, no estudo que realizaram com cavalos de sangue quente, puro sangue ingleses e cavalos de trote franceses, em concordância com alguns outros estudos que haviam anteriormente apontado para esta relação em outra espécie. No entanto, a influência das práticas de manejo nutricional sobre o rápido e precoce desenvolvimento destes animais não foi comprovada neste estudo (LEPEULE et al., 2013).

De forma geral, a literatura atual oferece fortes evidências para o papel dos fatores genéticos e anatômicos na etiologia da OC e pouca ou nenhuma evidência em relação ao papel do rápido crescimento, trauma e fatores nutricionais como contribuintes na sua instalação (YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007).

2.3 O ESTRESSE OXIDATIVO

2.3.1 Os Radicais Livres

Nos átomos, os elétrons ocupam regiões do espaço denominadas orbitais. Cada orbital comporta, no máximo, dois elétrons, que não se repelem porque giram em direções opostas (ou tem *spins* opostos) criando campos magnéticos que se atraem. Esta configuração é estável pois a força de atração, que é magnética, e a de repulsão, que é elétrica, encontram-se contrabalanceadas. Um radical livre é definido como qualquer molécula ou fragmento de

molécula capaz de existência independente, e que contém um ou mais elétrons não emparelhados, ou seja, um elétron sozinho, em seu orbital mais externo. Um elétron ocupando sozinho um orbital tem duas possibilidades de orientação de giro, o que os torna altamente reativos, com meia vida da ordem de microssegundos. Na busca de estabilidade estrutural, procuram combinar-se com outros átomos ou moléculas, de maneira a adquirir ou perder um elétron. Como a maioria das moléculas biológicas são não radicais, pois contém apenas elétrons pareados, sua interação com radicais livres frequentemente deflagra reações em cadeia, e o aparecimento de novos elementos instáveis, com elétrons não pareados.

Os radicais livres interagem com outras moléculas de várias maneiras; caso dois radicais reajam, eles podem combinar seus elétrons não pareados, unindo-se para formar uma ligação covalente, onde compartilham este par de elétrons. O átomo de hidrogênio é um exemplo da situação descrita acima; com um elétron não pareado, é um radical, e dois átomos de hidrogênio prontamente se combinam para formar a molécula de hidrogênio diatômica (H_2). Os radicais podem reagir com não radicais também de várias formas. Um radical pode doar seu elétron não pareado para um não radical (um radical redutor) ou pode tomar um elétron de outra molécula, para formar um par em seu orbital parcialmente ocupado (radical oxidante). Qualquer que seja o tipo de reação que ocorra, o não radical passa a ser um radical, e esta é uma característica das reações entre radicais livres e não radicais: elas tendem a se perpetuar em cadeia, com um radical se estabilizando e gerando outro radical, que por sua vez se ligará a outra molécula, fazendo dela um novo radical (HALLIWELL, 1991).

A perda de elétrons, ou o aumento no estado de oxidação de uma molécula, célula, átomo ou íon é conhecida como oxidação; o ganho de elétrons ou a diminuição do estado de oxidação é conhecido como redução. As reações de oxidação-redução (ou reações redox) também ocorrem acopladas, ou seja, não pode haver uma reação de oxidação sem que uma reação de redução esteja ocorrendo simultaneamente (JONES, 2006). A energia celular advém da movimentação de elétrons de moléculas orgânicas oxidáveis para o oxigênio, resultando num ambiente redutor nas células e tecidos. As chamadas “duplas redox” existentes nas células são responsáveis por este fluxo de elétrons e pelas alterações no ambiente oxidante/redutor. São exemplos, o par glutatona reduzida/glutatona oxidada e o par nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ($NADP^+$ ou forma oxidada) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). Cada etapa de transferência de um elétron tem um potencial de redução próprio, expresso em milivolts (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Desta forma, as reações redox transferem elétrons de um doador para um receptor mais eletronegativo, sucessivamente, caracterizando exatamente o que ocorre na cadeia de transporte de elétrons existente na membrana interna da mitocôndria. Estas reações se perpetuam até que os elétrons sejam transferidos para o oxigênio, a molécula mais eletronegativa, considerado como o receptor ou escoador terminal de elétrons na cadeia. As sucessivas passagens de elétrons liberam energia, que é utilizada para gerar um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial, pelo bombeamento ativo de prótons para o espaço entre as membranas. O gradiente eletroquímico de prótons gerado produz um estado termodinâmico que tem potencial para realizar trabalho, e propicia a síntese de adenosina trifosfato (ATP), num processo denominado de fosforilação oxidativa.

O oxigênio serve como substrato para fosforilação oxidativa, a principal reação bioquímica para a produção de ATP. A vida aeróbica, como um todo, depende da combustão controlada do oxigênio para suprimento de energia. Os organismos vivos aeróbicos desenvolveram sequências elaboradas de mecanismos adaptativos para a aquisição, utilização e distribuição de oxigênio como substrato energético. A combustão controlada é catalisada e regulada por um sofisticado maquinário metabólico, que pode ser danificado caso reações de oxidação não controladas, associadas a este processo de produção de energia, venham a ocorrer (HADDAD, 2004; JONES, 2006).

A extraordinária configuração da molécula de oxigênio, com dois elétrons não pareados, limita severamente sua reatividade, pois a reação oxidativa desta molécula, ou seja, a aquisição de um par de elétrons de outros átomos ou moléculas requer que seus dois elétrons assumam o mesmo número de *spin*, mas em sentidos opostos, para se ajustarem no espaço livre do orbital. Para participar de reações oxidativas, então, o oxigênio molecular deve ser ativado fisicamente por um processo foto dinâmico (resultando no oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que é altamente reativo, com um par instável de elétrons) ou pela redução de um elétron. Estas reações de transferências singulares de elétrons (ou reduções univalentes) dão origem, sucessivamente, ao radical superóxido (O_2^-), ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ao radical hidroxila (OH) e a água (GILLE; SIGLER, 1995).

Mais de 95% do oxigênio inspirado sofre redução tetravalente para produzir água, numa reação catalisada pela enzima citocromo oxidase, na cadeia de transporte de elétrons, no interior da mitocôndria. A mitocôndria é conhecida como a fonte energética das células por abrigar enzimas que catalisam as reações que possibilitam este fluxo de elétrons, com o objetivo final de produzir energia (ATP). Apesar da cadeia de transporte de elétrons da

mitocôndria ser um sistema bastante eficiente, a natureza dinâmica das reações de oxidação e redução que ela catalisa, gera uma série de radicais que constantemente se alternam e predispõe cada carreador de elétrons a reagir paralelamente com moléculas de oxigênio (CADENAS; DAVIES, 2000). Adicionalmente, durante a transdução de energia um pequeno número de elétrons “vaza” da cadeia de transporte, prematuramente, para o oxigênio, formando o radical superóxido. Estima-se que de 1 a 3% do total de elétrons da cadeia “vazem”, ao invés de contribuírem para a redução do oxigênio à água. Desta forma, a ocorrência de radicais livres do oxigênio é um atributo normal da vida aeróbica, que só se tornou viável devido à existência de mecanismos eficazes de adaptação e defesa contra estes radicais livres (SIES, 1991b).

Desta forma, a mitocôndria, principal consumidor de oxigênio molecular, desempenha um papel importante na produção destes derivados tóxicos, através do complexo citocromo oxidase (HALLIWELL, 1989). Estes intermediários estão tão fortemente ligados que nenhum radical do oxigênio ou H_2O_2 é liberado pela enzima (ANTONINI et al., 1970). Mesmo assim, a pequena porcentagem de elétrons que escapa da cadeia respiratória é capaz de dar origem às espécies reativas do oxigênio, que são então liberadas no meio (REILLY; BULKLEY, 1990), sendo o radical peróxido o primeiro subproduto que dela resulta.

2.3.2 As Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)

O termo “radicais livres do oxigênio” é geralmente utilizado de forma abrangente para designar todos os derivados reativos do oxigênio, incluindo aqueles que não são radicais, mas que tem alta propensão a formar radicais. Mais apropriadamente, estas substâncias altamente reativas recebem a designação de espécies reativas do oxigênio (EROs). Dentre as espécies reativas do oxigênio que não são radicais estão o peróxido de hidrogênio, por exemplo, que não possui elétrons não pareados e o oxigênio singleto (1O_2). O ácido hipocloroso, produzido pela enzima mieloperoxidase, também é um não radical, mas é um potente agente oxidante e, portanto, é considerado uma ERO (HALLIWELL, 1991).

O uso abrangente e genérico do termo ERO leva a uma noção incorreta de que todas estas espécies, abrigadas por este termo monolítico, têm ações e propriedades similares (MURPHY et al., 2011). As EROs devem ser consideradas particularmente e em relação ao

contexto biológico no qual estão inseridas (WINTERBOURN, 2008). Cada uma destas moléculas é uma entidade química distinta, com cinética, taxa e local de produção, difusão e sistemas de degradação peculiares. Assim, o impacto biológico de cada ERO depende criticamente da molécula em questão, do microambiente e do contexto, fisiológico ou não, onde ela é gerada. Agrupar todas as EROs como uma entidade única leva a hipóteses vagas e de difícil confirmação. Portanto, sempre que possível, as EROs consideradas como responsáveis pelo fenômeno em observação devem ser tomadas individualmente para estudo (MURPHY et al., 2011).

2.3.3 A síntese das EROs

Apesar das EROs poderem ser sintetizadas por várias enzimas citoplasmáticas, incluindo a xantina oxidase, a lipoxigenase, a cicloxigenase, a óxido nítrico sintase, além de provirem dos processos fisiológicos das mitocôndrias, a maioria das EROs deriva da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase reduzida (NADPH oxidase), encontrada no interior dos fagócitos. Este complexo enzimático multi compartimental de transferência de elétrons, ligado à membrana celular do fagócito, sofre várias modificações em seus componentes intracelulares para tornar-se funcional durante a ativação leucocitária. A ativação da enzima NADPH oxidase é um processo complexo que consiste de várias etapas e é iniciado não só por bactérias, mas também por alguns produtos químicos. A consequência inevitável da ativação desta enzima, além da produção de energia para a célula, é a produção de subprodutos da respiração celular pelo escape eventual de elétrons, que são as EROs.

Os fagócitos podem ser induzidos a liberar EROs para os meios extra e intracelular através de sinais de ativação, acompanhados ou não de fagocitose. Os fatores desencadeadores da produção de EROs são uma combinação de eventos de ligações moleculares consequentes a processos infecciosos, enfermidades diversas, feridas e à introdução cirúrgica de material estranho no organismo. Esta forma de liberação de EROs pode se dar através da ativação de receptores específicos por proteínas do sistema complemento, que resultará em transdução de um sinal pró-inflamatório, culminando com a fagocitose, a ativação da NADPH oxidase e a degranulação dos neutrófilos. Os receptores de reconhecimento de padrões, presentes em fagócitos e várias células, também participam da

geração das EROs. Eles reconhecem e se ligam a uma série de biomoléculas altamente conservadas, os PAMPs ou os DAMPs. A estimulação dos PRRs resulta numa grande quantidade de eventos de transcrição intracelular, que levam à produção de citocinas, além de estimular a ativação e funcionamento da NADPH oxidase.

A liberação de citocinas não só incrementa a explosão respiratória pelos fagócitos, mas também tem a capacidade de modular esta explosão. Neste caso, as citocinas não incitam diretamente a produção de EROs, mas hipersensibilizam as células ao estímulo de um ligante bacteriano, resultando em uma resposta mais rápida e amplificada frente a um agente nocivo (BRYAN et al., 2012).

2.3.4 A NADPH oxidase

A NADPH oxidase é um complexo enzimático multi proteico, responsável pela transferência de elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) para o oxigênio molecular, resultando na formação do ânion superóxido. Para desempenhar esta função, é necessário que o complexo enzimático seja ativado. Na célula em repouso, as proteínas constituintes da NADPH oxidase encontram-se segregadas entre a membrana e o citosol (EL-BENNA et al., 2005; EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008). Durante o processo de ativação da célula, oxidases citosólicas componentes da enzima, que são as proteínas oxidase-específicas, a saber: $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e uma GTPase (Rac1/2), translocam para o fagossomo ou para a membrana plasmática, onde se unem em torno de um componente central, ligado à membrana, denominado flavocitocromo b_{558} . O flavocitocromo b_{558} é formado pelos componentes catalíticos $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$. Este processo de acoplamento e ativação é altamente regulado, envolvendo reações de fosforilação, translocação e múltiplas alterações de conformação da enzima (QUINN; GAUSS, 2004).

A NADPH oxidase está presente não somente em células fagocíticas, mas também em uma variedade de outros tipos celulares, e estruturalmente estes complexos enzimáticos são bastante similares, apesar de se prestarem a diferentes funções. As EROs geradas pelas NADPH oxidases de células não fagocíticas parecem estar primariamente envolvidas com a sinalização intra e intercelular, mais do que com os mecanismos de defesa do hospedeiro (QUINN; GAUSS, 2004; BRYAN et al., 2012). Ainda, as NADPH oxidases de células não

fagocíticas produzem o radical superóxido na fração de 1 a 10% dos níveis produzidos pelos neutrófilos (VALKO et al., 2007).

Uma série de inibidores da NADPH oxidase foi descrita, e moléculas biológicas estão entre eles. São exemplos o óxido nítrico (NO) (CLANCY; LESZCZYNSKA-PIZIAK; ABRAMSON, 1992), os esteroides (LAUFS et al., 2003), a adrenalina (O'DOWD et al., 2004), a interleucina-10 (IL-10) (ELBIM et al., 2001) e a interleucina 4 (IL-4) (ZHOU; LIN; MURTAUGH, 1995).

2.3.5 O Radical Superóxido (O_2^-)

As fontes mais importantes de O_2^- , *in vivo*, são a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, o retículo endoplasmático e os cloroplastos (HALLIWELL, 1989). O principal vazamento de elétrons na mitocôndria ocorre através do complexo NADH-ubiquinona redutase, um dos quatro complexos enzimáticos da cadeia respiratória, e através da forma reduzida da ubiquinona (TURRENS, 1982).

O sistema mais eficiente de produção de radical superóxido é a enzima NADPH oxidase, que se encontra ligada a membrana de células fagocíticas ativas (CURNUTTE; BABIOR, 1987), e é de grande importância para as células animais. Com o início da fagocitose, estas células exibem um dramático aumento do consumo de oxigênio, conhecido como explosão respiratória (ou *burst* respiratório), processo que em nada se relaciona com a respiração mitocondrial. Outro sistema capaz de gerar radical superóxido em cadeias de transporte de elétrons é a cadeia que utiliza NADH ou NADPH da membrana nuclear, cuja função é ainda desconhecida. Uma vez que os radicais são gerados nas proximidades do DNA celular, especula-se que este sistema possa ter um especial significado, *in vivo* (HALLIWELL, 1991).

O outro processo capaz de gerar o radical superóxido é a reação auto-oxidativa da célula. Na presença de oxigênio muitas substâncias - como por exemplo, o gliceraldeído, os nucleotídeos de flavina reduzidos, a adrenalina e os compostos tióis, tais como a cisteína - sofrem oxidações espontâneas. Uma importante reação auto-oxidativa ocorre com a hemoglobina carreando oxigênio, a oxihemoglobina, que é oxidada a sua forma inativa, a

metemoglobina, com concomitante liberação de radical superóxido. A metemoglobina contém ferro no núcleo heme, na forma de Fe^{3+} , e é incapaz de se ligar ao oxigênio (HALLIWELL, 1989).

A reatividade dos radicais superóxido depende largamente da natureza do meio onde se encontram. Eles são altamente reativos e estáveis em meio hidrofóbico, enquanto em meio hidrofílico têm baixa reatividade e desaparecem rapidamente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). Em solventes orgânicos, o radical superóxido é uma base forte e nucleofílica, enquanto em solução aquosa possui propriedades redutoras e ao mesmo tempo fracamente oxidantes, caracterizando reações redox denominadas de desproporcionamento. Nas reações de desproporcionamento uma substância é, ao mesmo tempo, oxidada e reduzida, dando origem a dois produtos diferentes. Em relação ao radical superóxido, estas reações são mais rápidas em pH ácido e geram H_2O_2 . Dadas as suas propriedades redutoras, o radical superóxido pode reduzir, por exemplo, o citocromo da cadeia respiratória mitocondrial (MCCORD; CRAPO; FRIDOVICH, 1977). Suas propriedades fracamente oxidantes o tornam capaz de oxidar catecolaminas, tocoferol, ascorbato, a NADH ligada ao lactato e vários tióis. O ferro também pode ser oxidado ou reduzido pelos radicais superóxido.

Apesar do O_2^- ter reatividade limitada em solução aquosa, sua rápida e eficiente eliminação é de grande importância para a célula, uma vez que ele pode dar origem a EROs mais deletérias. A eliminação do radical peróxido da célula é realizada pela enzima superóxido dismutase (SOD).

2.3.6 O Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Todos os sistemas que produzem o radical peróxido produzem também o peróxido de hidrogênio, dada a ocorrência de reações de desproporcionamento. Estas reações, sejam não enzimáticas ou enzimáticas (catalisadas pela SOD), são uma das principais fontes de H_2O_2 , *in vivo*. Ainda, em adição aos sistemas que geram radical superóxido, várias oxidases contendo flavina participam da produção direta de H_2O_2 .

Da mesma forma que o radical superóxido, o H_2O_2 pode servir como um agente oxidante ou redutor, e sua reatividade também é bastante limitada em soluções aquosas.

Contudo, ao contrário do O_2^- , o H_2O_2 consegue penetrar através de todas as membranas biológicas, podendo causar danos através de reações de radicais, mesmo em locais consideravelmente remotos, em relação a seu sítio de produção (SARAN; BORS, 1991). A importância do peróxido de hidrogênio reside na sua capacidade de participar da formação de radicais hidroxila ($OH^\cdot$), que são extraordinariamente reativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). Também é relevante a capacidade do peróxido de hidrogênio de formar compostos com muitos componentes de sistemas bioquímicos. Estas estruturas ligadas pelo hidrogênio atuam como carreadores do H_2O_2 e expandem largamente seu campo de difusão (GILLE; SIGLER, 1995).

A catalase (CAT) é a enzima mais conhecida capaz de catalisar a dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

2.3.7 O Radical Hidroxila ($OH^\cdot$)

Conforme mencionado, a reatividade dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio é relativamente baixa. É portanto aceito que a maior parcela de dano celular causada por eles deva-se à sua conversão em radicais hidroxila, que são altamente reativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1988; ARUOMA; HALLIWELL; DIZDAROGLU, 1989). A reação entre H_2O_2 e O_2^- formando $OH^\cdot$ é conhecida como reação de Harber e Weiss, e em soluções aquosas só ocorre em níveis expressivos na presença de pequenas quantidades de metais de transição, como o ferro, e que imprimem a ela grande celeridade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). Os íon de cobre também podem participar da formação dos radicais hidroxila (HALLIWELL, 1989), mas o ferro é o agente mais importante na reação.

Dada a grande importância do ferro na produção do radical $OH^\cdot$, *in vivo*, é necessário identificar os locais de ocorrência do ferro, que auxiliariam na formação destes radicais. Os sistemas biológicos não contêm sais de ferro livre, estando ele sempre ligado a proteínas, membranas, ácidos nucleicos, ou agentes quelantes de baixo peso molar (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). O ferro que não é imediatamente utilizado pelas células é armazenado, ligado à ferritina, ou combina-se com a transferrina, que funciona como proteína de transporte (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). A ferritina contém em seu interior mais de 4500 íons Fe^{3+} ; estes podem ser liberados, *in vivo*, na forma de Fe^{2+} , quer seja através da

ação de agentes redutores como o ascorbato (CRICHTON; CHARLOTEAUX-WAUTERS, 1987) ou O_2^- ou após uma queda de pH a valores inferiores a 6 (BAST; HAENEN; DOELMAN, 1991). A glicoproteína transferrina possui dois locais para a ligação com o Fe^{3+} . A ligação é extremamente forte com valores de pH fisiológicos, mas os íons podem ser liberados com valores de pH inferiores a 5,6.

O radical OH^- é uma das espécies químicas mais reativas de que se tem conhecimento. Ela reage imediatamente, no local de sua formação, com todos os tipos de moléculas das células, tais como açúcares, aminoácidos, fosfolípides, nucleotídeos e ácidos orgânicos. As reações com o radical hidroxila podem ser de três tipos. O primeiro tipo de reação se dá através da eliminação de um átomo de hidrogênio; o segundo, pela adição de ligações duplas ou anéis aromáticos e o terceiro, pela transferência de elétrons (HALLIWELL, 1989). Estas reações documentam um princípio extremamente importante da química dos radicais, segundo o qual reações de uma substância radical com um não radical sempre dão origem a outro radical, com maior ou menor reatividade. Esta sequência de reações continua até que uma molécula final estável seja formada. A agressividade do radical OH^- é tal, que todos os produtos de suas reações são menos reativos que ele; estes subprodutos podem, contudo, causar danos severos às células, pelas reações em cadeia das quais tomam parte, envolvendo peroxidação de lipídeos, lesões ao DNA ou oxidação de proteínas.

O dano biológico mais bem caracterizado que o radical hidroxila causa é a peroxidação lipídica, o resultado final de uma série de reações em cadeia que ocorre quando o radical é gerado próximo à membranas celulares. Neste local o OH^- ataca as cadeias de ácidos graxos laterais dos fosfolípides de membrana, preferencialmente os do tipo polinsaturados, como o ácido aracdônico. A reação com proteínas da membrana também é uma possibilidade.

Em contraste com o que ocorre com H_2O_2 e o O_2^- , não existe proteção enzimática contra o radical OH^- . Como ele reage virtualmente com todas as moléculas na célula, a prevenção de sua formação através de um controle rigoroso do metabolismo do ferro é da mais alta importância. Contudo, mesmo este mecanismo não previne a formação deste radical completamente, especialmente quando ela é facilitada por fatores externos ou em vigência de enfermidades (GILLE; SIGLER, 1995).

2.3.8 Defesas antioxidantes

A detoxificação das EROs é um dos pré-requisitos para a vida aeróbica. Por este motivo os organismos aeróbicos desenvolveram um conjunto complexo de mecanismos de defesa, que lhes permitiu tolerar a ocorrência de subprodutos da utilização do oxigênio, paralelamente ao surgimento de cadeias de transporte de elétrons e de sistemas enzimáticos que viabilizavam seu uso como combustível celular. Estes importantes sistemas de proteção antioxidante previnem, interceptam e reparam o dano oxidativo às células (SIES, 1991a, ARUOMA, 1998; JONES, 2006).

Entre os constituintes celulares existem moléculas particularmente predispostas a reagir com o radical hidroxila ou outros radicais; estas moléculas que removem radicais, ou cessam as reações que envolvem radicais, são chamadas de antioxidantes. Elas auxiliam a reduzir os efeitos da oxidação não controlada, que representa uma importante ameaça à integridade de várias moléculas.

Estes sistemas de defesa contra as EROs são classificados em primários, quando compreendem processos enzimáticos e de sequestro de íons metais, e secundários ou não enzimáticos (SIES, 1991a). O controle genético dos mecanismos de defesa antioxidante foi demonstrado através de estudos com microrganismos, e sua estreita relação com outras respostas adaptativas reforça sua função central na evolução e desenvolvimento dos organismos vivos (SIES, 1991b).

2.3.9 Proteção Enzimática contra as EROs

2.3.9.1 A superóxido dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase (SOD) é a responsável pela eliminação do radical superóxido na célula e seu papel central na proteção contra as ações deletérias das EROS tem sido documentado na extensa literatura dedicada ao assunto. A SOD se encontra principalmente no compartimento intracelular, nas mitocôndrias e no citosol. Apenas

pequenas quantidades estão presentes nos fluidos extracelulares como o plasma, o líquido cérebro-espinhal ou o líquido sinovial (ARUOMA, 1998).

Três tipos de SODs são conhecidos e podem ser classificados em duas famílias evolucionárias: a SOD cobre-zinco (CuZnSOD) e a SOD contendo manganês (Mn SOD), que se relacionam mutuamente, e a SOD que contém ferro (FeSOD) (FRIDOVICH, 1989).

A CuZnSOD é encontrada no citoplasma de praticamente todas as células eucariotas e na matriz dos lisossomos. A reação não catalisada do radical superóxido é pH dependente, mas a reação catalisada pela CuZnSOD é não só pH independente (entre valores de pH de 5,3 a 9,5), mas é também muito mais eficiente. A enzima é constituída de duas subunidades, cada uma contendo um íon de zinco e um íon de cobre (HALLIWELL, 1989). A maioria da superfície destas subunidades tem uma carga negativa, mas os canais ativos, contudo, tem carga positiva, de forma que o radical superóxido aniônico é dirigido eletrostaticamente em direção a este centro ativo. O íon cobre ligado ao centro ativo da enzima toma parte nas reações de desproporcionamento, através de etapas de oxidação e redução que se alteram. O íon zinco parece ter uma função de estabilização.

Foi demonstrado ainda que a SOD também produz radicais hidroxila através do peróxido de hidrogênio, durante o processo de inativação. Estes radicais hidroxila podem deixar o canal ativo e atacar outras moléculas na célula (YIM; CHOCK; STADTMAN, 1990). No entanto, a SOD tem baixa afinidade pelo H_2O_2 . De qualquer forma, um fino equilíbrio entre a catalase (ou outras peroxidases) é muito importante para a célula. Quando não há adequada remoção de peróxido de hidrogênio, a formação do deletério radical hidroxila pela ação catalisadora da SOD pode ocorrer. Este mecanismo pode explicar, em parte, os diferentes tipos de danos sofridos pelas células que tem atividade da SOD aumentada. Um pequeno aumento da atividade da SOD também resulta em produção excessiva de peróxido de hidrogênio e aumento da propensão das células de produzir quantidades expressivas do radical hidroxila (AMSTAD et al., 1991). Assim, apesar da grande importância da SOD, ela não pode ser considerada como a principal enzima antioxidante da célula, uma vez que seu incremento também está associado a um aumento da produção dos oxidantes peróxido de hidrogênio e hidroxila (YIM; CHOCK; STADTMAN, 1990; YIM; CHOCK; STADTMAN, 1993). É provável que nenhuma enzima, por si só, desempenhe um papel central na proteção eficiente contra as EROS, mas que esta proteção advenha da interação coordenada de todas as enzimas antioxidantes e substâncias existentes no interior da célula.

A administração intra-articular da SOD pareceu ser útil na prevenção do dano oxidativo à componentes articulares em equinos (AUER; NG; SEAWRIGHT, 1990b; SIES, 1991b).

A MnSOD é encontrada em procariotas, na matriz mitocondrial e nos cloroplastos dos eucariotas. A FeSOD é encontrada principalmente em procariotas, mas também em protozoários e algumas plantas (GILLE; SIGLER, 1995).

2.3.9.2 A catalase

A catalase (CAT) é a enzima mais conhecida capaz de catalisar a dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Ela é expressa em diversos tecidos no organismo e é encontrada no interior de organelas intracelulares conhecidas como peroxisomos, sendo necessário que o peróxido de hidrogênio se difunda para o interior destes compartimentos para sofrer detoxificação (BRYAN et al., 2012). Os peroxisomos são locais preferenciais de consumo de oxigênio na célula e participam de uma série de reações metabólicas que utilizam o oxigênio. O peroxisomo mantém o delicado equilíbrio no que diz respeito às concentrações relativas ou atividade da catalase, para garantir que não haja produção líquida de EROs. Quando os peroxisomos são danificados e as enzimas consumidoras estão diminuídas, o peróxido de hidrogênio é liberado para o citosol, contribuindo significativamente para o dano oxidativo (VALKO et al., 2007).

2.3.9.3 A Glutathione Peroxidase (GPx)

Outra fonte importante de proteção enzimática contra o H_2O_2 é conferida pelas peroxidases, sendo a glutathione peroxidase (GPx) a enzima mais importante deste grupo. A GPx é encontrada na mitocôndria, no citosol e membranas celulares e metaboliza o H_2O_2 , entre outros peróxidos orgânicos, tendo como substrato específico a glutathione, que serve como doador de elétrons. Ela catalisa a oxidação da glutathione reduzida (GSH) para sua forma oxidada (GSSG), com concomitante consumo de H_2O_2 (HALLIWELL, 1989). A redução da

GSSG para GSH se dá através da enzima glutathione redutase, com o consumo de NADPH e H^+ . O aumento do consumo de NADPH + H^+ e GSH com aumento da atividade da GPx deu origem a hipótese de que a enzima opera através de um mecanismo de toxicidade crescente (FARBER; KYLE; COLEMAN, 1990), uma vez que o aumento da concentração de GSSG é associado com a liberação de cálcio para o citosol, levando à severo dano celular, à lesões no citoesqueleto (THOR et al., 1988) e ao aumento da hidrólise de fosfolípidos ou proteínas (NICOTERA et al., 1985), que resultam, frequentemente, em morte celular.

A importante função catalisadora da glutathione peroxidase na quebra do H_2O_2 é enfatizada pela observação de que ela frequentemente opera juntamente com a catalase, e de que elas participam com igual relevância na reação de catalisação (GAETANI et al., 1989).

2.3.10 Proteção não enzimática contra as EROs

Uma forma eficiente de proteção contra a geração de EROs é o sequestro de íons metais. Ela consiste na manutenção de íons ferro e cobre seguramente ligados a proteínas de armazenamento e de transporte, de sorte que formas livres destes íons não estejam disponíveis para reações de óxido-redução. Existe três vezes mais transferrina do que ferro para ser transportado, garantindo que não existam íons ferro livres no plasma. Ligados à transferrina, os íons ferro não são capazes de estimular a peroxidação lipídica ou de induzir a formação de radicais $OH^{\cdot}$, nem de impedir que o ascorbato exerça suas propriedades antioxidantes. Adicionalmente, dois terços do estoque de ferro do organismo estão ligados à hemoglobina, 10% está ligado a mioglobina e uma pequena proporção está associada a enzimas. As proteínas intracelulares capazes de armazenar o ferro são a ferritina e a hemossiderina. O mesmo é verdade para os íons cobre, que no plasma encontram-se ligados à proteína ceruloplasmina ou à albumina (HALLIWELL, 1991).

Os antioxidantes celulares não enzimáticos podem ser divididos em hidrossolúveis e lipossolúveis. Estes dois grupos mantêm relações importantes, necessárias para os processos regenerativos dos não radicais a que dão origem no processo de detoxificação (SIES, 1991a).

Os antioxidantes hidrossolúveis mais importantes são o ácido ascórbico (ou vitamina C ou ascorbato) e a glutatona; entre os lipossolúveis os mais importantes são a vitamina E (ou tocoferóis) e os carotenoides derivados das plantas.

2.3.10.1 A Vitamina C

O ascorbato, forma ionizada do ácido ascórbico, exibe muitas propriedades antioxidantes, dentre elas, a capacidade de remover radicais peróxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio, além da capacidade de participar da regeneração da vitamina E. As propriedades antioxidantes do ascorbato advêm principalmente do fato de que o radical semidehidroascorbato tem reatividade muito baixa (BIELSKI; RICHTER; CHAN, 1975) e, ou se desintegra através de reações de desproporcionamento, servindo para frear as reações em cadeia de radicais, ou é enzimaticamente reduzido a ascorbato, sob consumo concomitante de NADH ou GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Em adição a suas propriedades antioxidantes, o ascorbato também pode realizar a reação inversa, ou seja, a de oxidação. Esta propriedade está associada a sua capacidade de reduzir o ferro de Fe^{3+} a Fe^{2+} e o O_2 para H_2O_2 , fato que disponibiliza todos os componentes necessários para a reação de Fenton. O fator chave parece ser a quantidade de íons férricos disponíveis, que são indispensáveis para a ação de oxidação do ascorbato. Contudo, o papel do ascorbato como oxidante, *in vivo*, sob condições fisiológicas ainda é desconhecido e não foi demonstrado.

2.3.10.2 A Glutaciona (GSH)

A glutatona é o principal e mais abundante tiol (molécula que contém um radical SH) de baixo peso molecular e desempenha várias funções na célula (SIES, 1991a; FORMAN et al., 2008). A glutatona é abundante no citosol, no núcleo e na mitocôndria, sendo o principal antioxidante solúvel nas células. No núcleo, a glutatona mantém o equilíbrio entre as reações de oxidação e redução (equilíbrio redox) de proteínas, vitais para a expressão e reparo do

DNA (VALKO et al., 2007). Este fenômeno ocorre na célula, de um modo geral (CIRCU; AW, 2010). A relação da distribuição de GSH entre o citosol e o núcleo é um processo dinâmico que se correlaciona com a progressão do ciclo celular; a concentração de GSH nuclear excede em quatro vezes a do citosol na fase de proliferação celular, e se iguala nos dois compartimentos quando as células alcançam a confluência (CHEN et al., 2003; MARKOVIC et al., 2007). Um estoque de GSH mitocondrial distinto preserva a integridade das proteínas e lipídeos da mitocôndria e controla a geração de EROs nesta organela celular.

A glutathiona é um tiol antioxidante presente em todos os tecidos e forma um sistema tampão redox quando acoplada com sua forma dissulfídica oxidada (uma “dupla redox”), além de participar na regulação da transdução de sinais quando da ocorrência do estresse oxidativo (HADDAD; HARB, 2005).

A glutathiona participa como cofator de várias enzimas que desempenham atividades metabólicas bastante distintas e como substrato para enzimas antioxidantes, tais como a glutathiona peroxidase ou a dehidroascorbato redutase. Atua, ainda, como tampão celular redox, regenera o ascorbato e o α -tocoferol, além de ser um captador direto dos radicais hidroxila e oxigênio singlete (HALLIWELL, 1989; SIES, 1991a; VALKO et al., 2007).

A glutathiona reduzida é a forma biologicamente ativa e que é oxidada a glutathiona dissulfídeo (GSSG) durante o estresse oxidativo; sua oxidação é um processo reversível e representa um mecanismo funcional sensível, regulado pelo estado redox. Desta forma, a relação GSH:GSSG oferece uma expressão simples e conveniente do estresse oxidativo celular. Tipicamente, as células exibem uma relação elevada de glutathiona reduzida para GSSG, e mais de 90% da glutathiona total é mantida na forma reduzida no citoplasma, através de sua síntese, *de novo*, da redução enzimática da GSSG a GSH pela GSSG redutase, e da captação exógena de GSH.

2.3.10.3 A Metalotioneína

A metalotioneína é uma proteína largamente difundida no organismo, e que tem a propriedade de se ligar a metais pesados. Ela serve para sequestrar estes metais pesados sob uma forma não tóxica, e assim regular as concentrações de cobre e zinco, evitando que eles

participem na formação de radicais de oxigênio. Células expostas à produção aumentada de radicais de oxigênio também exibem aumento da síntese de metalotioneína. Não há muita informação detalhada a respeito da contribuição desta proteína na remoção de radicais produzidos pela célula, uma vez que ela está presente em quantidades substancialmente inferiores às dos outros captadores de radicais, como a glutatona. No entanto, sob condições de estresse, quando a concentração de glutatona cai e a de metalotioneína aumenta, esta última pode desempenhar um papel importante como captadora de radicais (SATO; BREMNER, 1993).

2.3.10.4 A Vitamina E

A vitamina E desempenha um papel central entre os antioxidantes lipossolúveis, sendo o mais eficiente e importante na interrupção de eventos degradadores de membrana associados às EROs. Ela é atualmente tomada como sinônimo do α -tocoferol, apesar de na verdade incluir um grupo de oito tocoferóis estreitamente relacionados. A vitamina E extingue o oxigênio singlete, capta os radicais peróxido e o peróxido de hidrogênio, além de reagir com o $\text{OH}^\cdot$. Sua principal tarefa, contudo, é frear as reações em cadeia de radicais, que estão por trás do processo de peroxidação lipídica sediado nas membranas biológicas (HALLIWELL, 1989; NIKI et al., 1991).

As membranas celulares e as lipoproteínas plasmáticas contêm α -tocoferol e apesar da proporção de vitamina E para ácidos graxos insaturados nas membranas ser de 1:1000, sua constante de reação com os radicais do oxigênio é muito maior que a dos outros lipídeos. O grupo $\text{OH}^\cdot$ ligado à estrutura hidrofóbica do α -tocoferol é um doador de átomos de hidrogênio; ele se combina com os radicais peroxil e alkoxil formados durante a peroxidação lipídica, impedindo que estes radicais se liguem a cadeias adjacentes de ácidos graxos e perpetuem a reação. Desta forma, a vitamina E atua como um antioxidante que interrompe a cadeia de reações oxidativas responsáveis pelo dano celular e tecidual (HALLIWELL, 1991). O radical tocoferol migra para a superfície da membrana é convertido de volta a α -tocoferol, através de um doador de hidrogênio hidrossolúvel (SIES, 1991a; SIES, 1991b). Um possível doador de hidrogênio é o ascorbato, apesar deste fato não ter se comprovado *in vivo* (CHOW, 1991). Outra via através da qual a vitamina E pode se regenerar é a da redução enzimática da

glutathiona (AUST, 1990). Como ocorre com o ascorbato, a interação destas moléculas, *in vivo*, ainda necessita de maiores esclarecimentos, mas a existência de uma estreita inter-relação funcional dos sistemas antioxidantes individuais é clara. De qualquer forma, tanto a vitamina C quanto a vitamina E podem minimizar as consequências da peroxidação lipídica sobre as lipoproteínas e as membranas, caso o processo se inicie.

2.3.10.5 Os carotenoides

Outro grupo importante de antioxidantes lipossolúveis inclui os carotenoides derivados de plantas. Os carotenoides que são fartamente encontrados em animais derivam-se da ingestão dos carotenoides vegetais. Eles são classificados em dois grupos, os β -carotenos e as xantofilas, derivados do caroteno que contém oxigênio. Eles são excelentes eliminadores do oxigênio singlete (BENSASON; LAND; MAUDINAS, 1976) e por isso estão associados ao aparelho de fotossíntese.

Os carotenoides exercem uma ação preventiva, absorvendo a energia das formas de clorofila que poderiam dar origem ao oxigênio singlete e podem, ainda, reagir diretamente com outras EROs como os radicais peroxil e alkoxil, prevenindo a peroxidação lipídica.

2.3.11 O estresse oxidativo - definição

O estresse oxidativo é classicamente definido como o desequilíbrio entre a produção de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes em favor das substâncias pró-oxidantes, capaz de causar dano às células (SIES, 1991a). Isto quer dizer que quando a formação de pró-oxidantes deixa de ser neutralizada por sua remoção pelos sistemas antioxidantes de proteção celular, o estresse oxidativo de curto ou longo prazo ocorre. O estresse oxidativo se reflete pelo aparecimento de produtos resultantes do dano celular, oriundos do DNA, de proteínas, de açúcares e lipídeos.

Uma limitação desta definição de estresse oxidativo é que ela pressupõe que sistemas biológicos distintos respondem da mesma maneira à diminuição de pró-oxidantes e ao

aumento de antioxidantes. Se os mecanismos do estresse oxidativo estivessem limitados ao dano causado pela ação dos radicais livres ao maquinário macromolecular, este conceito seria provavelmente adequado. Contudo, conforme veremos a seguir, o estresse oxidativo exerce efeitos sobre o controle da chamada sinalização redox, interferindo no resultado das reações de oxidação e redução que ocorrem nas células. Múltiplos sistemas biológicos são afetados pela geração de EROs, e não há razão para assumir que eles teriam a mesma sensibilidade em relação a oxidantes ou as mesmas respostas frente a antioxidantes, de uma forma generalizada. Assim, uma definição alternativa é proposta para o estresse oxidativo, como a condição onde ocorre perturbação da sinalização celular e do controle das reações de oxidação e redução (JONES, 2006).

O número de enfermidades onde a participação das EROs foi comprovada é surpreendente. Exemplos são a arteriosclerose, a artrite, a catarata ocular, o câncer e as injúrias de isquemia-reperfusão. Através de modificações pontuais, deleções e amplificações as EROs podem induzir modificações permanentes na sequência de DNA, capazes de ativar proto oncogenes ou inativar genes supressivos tumorais. Em adição às alterações estruturais e herdáveis do DNA, elas podem causar efeitos epigenéticos, que por sua vez, levam a ativação transitória de genes que determinam crescimento e diferenciação celular. (GILLE; SIGLER, 1995).

Os efeitos do estresse oxidativo são múltiplos e diferem de célula para célula. Um efeito muito importante é o dano oxidativo causado à mitocôndria. Ele leva à liberação de cálcio, ao desacoplamento das reações de produção de energia, à dissipação do gradiente de prótons e falta de energia, que cessa a síntese de ATP (RICHTER; KASS, 1991). A mitocôndria é, desta forma, não apenas fonte de EROs, mas também o alvo primário destas espécies.

As membranas são danificadas pelo estresse oxidativo através do processo conhecido como peroxidação lipídica e também pelo impedimento da metilação dos fosfolípidos, que é responsável pelos ajustes de fluidez da membrana e pelas atividades enzimáticas nela sediadas (KANEKO et al., 1990).

Enquanto o dano oxidativo que atinge lipídeos e proteínas pode ser reparado, em alguma extensão, aquele que ocorre no DNA mina as habilidades sintéticas das células e sua capacidade replicativa. Por exemplo, as células de mamíferos que sofrem significativa quebra das fitas de DNA podem exibir aumentada ativação da enzima que participa do seu reparo;

quando altamente ativada, esta enzima reduz drasticamente os níveis de NAD^+ e de ATP na célula, levando ao esgotamento dos estoques de energia e a morte celular (BERGER, 1991; KIRKLAND, 1991).

O dano celular advindo do estresse oxidativo está diretamente implicado nos fenômenos de envelhecimento das células e do organismo como um todo e também na senescência celular. A teoria dos radicais livres do envelhecimento, proposta por Harman (1956) sugere que o envelhecimento natural deve-se à produção inevitável de radicais livres durante o metabolismo do oxigênio. Estes radicais danificam aleatoriamente moléculas biológicas e o acúmulo destes eventos degenerativos resulta no processo de envelhecimento. O ponto fraco desta teoria é que ela considera o envelhecimento como um processo puramente aleatório, reflexo do que acontece com o envelhecimento da célula. Na realidade, o envelhecimento é uma sequência de eventos ordenados e irreversíveis, que possuem uma base genética. Desta forma, Sohal e Allen (1990) propuseram uma hipótese alternativa, a qual denominaram “hipótese do envelhecimento pelo dano oxidativo”. Segundo esta hipótese, o processo de envelhecimento é visto como o estágio de desenvolvimento final do organismo, que ocorre através da ação do estresse oxidativo nos programas genéticos. Este estresse se intensifica durante a diferenciação e a senescência celular. Neste contexto, quatro mecanismos foram propostos para justificar os efeitos das EROs sobre a expressão genética.

O primeiro diz respeito a alterações na distribuição de íons. Durante o desenvolvimento celular, a produção aumentada de EROs pode levar à liberação de íons cálcio armazenados na mitocôndria, desencadeando uma cascata de eventos bioquímicos, que culmina com alterações na expressão genética.

O segundo é ativação genética direta pelas EROs. A ação direta destas espécies sobre os genes foi demonstrada em bactérias, onde a exposição a baixas doses de peróxido de hidrogênio levou à indução de mais de 30 proteínas, nove das quais estão sob o controle do gene *oxyR*.

O terceiro mecanismo consiste nos efeitos do estresse oxidativo sobre o citoesqueleto e a matriz nuclear, com repercussão sobre a configuração da cromatina e sobre o processamento do RNA mensageiro. A expressão genética é fortemente afetada pela configuração espacial da cromatina. O citoesqueleto assegura a conexão entre a cromatina e a membrana plasmática, e assim permite uma comunicação entre as duas estruturas. Alterações

na fluidez da membrana provocadas pelas EROs podem, adicionalmente, provocar alterações na estrutura da cromatina.

O quarto mecanismo reflete as alterações na expressão genética causadas pelas mudanças no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, consequentes à capacidade das EROs de alterar o ambiente celular.

2.3.12 O papel das EROs nos processos biológicos

Apesar das pesquisas se concentrarem predominantemente sobre os efeitos danosos sobre as células, é necessário lembrar que as EROs também desempenham papel fundamental em uma série de eventos fisiológicos. Numerosos processos moleculares e celulares envolvem radicais reativos e seus intermediários. São exemplos, a produção de EROs pelos fagócitos participando dos processos de defesa contra micro-organismos, a produção de EROs por células não fagocíticas atuando na sinalização intracelular, a regulação do tônus vascular pelas EROs, além da participação de EROs como sensores de alterações na concentração de oxigênio nas células, na regulação da adesão celular, na modulação das respostas imunes pelo equilíbrio redox, no crescimento celular e na indução da apoptose (VALKO et al., 2007).

As EROs tem um papel fundamental na imunidade inata e formam a primeira linha de defesa contra micro-organismos invasores (BRYAN et al., 2012). A explosão respiratória (ou *burst* respiratório) que ocorre no interior das células fagocitárias ativas resulta do expressivo aumento no consumo de oxigênio por estas células, através do processo gradual de redução de um elétron do oxigênio pela enzima NADPH oxidase (CURNUTTE; BARBIOR, 1987). Esta reação reveste-se de especial importância, pois é responsável morte de inúmeras bactérias, que ao entrarem em contato com a membrana plasmática do fagócito, são engolfadas por uma vesícula desta membrana. As vesículas contêm NADPH oxidase, e assim as bactérias são expostas a um fluxo intenso de radicais peróxido. Este radical pode sofrer uma reação de desproporcionamento, gerando H_2O_2 , que penetra na bactéria, produzindo radicais $OH^\bullet$ (GILLE; SIGLER, 1995).

Tipicamente consideradas vitais por seu papel vigilante durante a inflamação e na defesa do hospedeiro, as EROs têm seus efeitos sinalizadores colocados em segundo plano.

Ainda em relação a este relevante papel sinalizador, são preteridas em favor de moléculas proteicas, mais especificamente citocinas e fatores de crescimento. Contudo, as EROs são consideradas sinalizadores ideais, devido à complexidade e ao controle a que sua síntese e degradação estão sujeitas (BRYAN et al., 2012).

As EROs desempenham um papel primordial como segundo-mensageiros (SARAN; BORS, 1989) ou sinalizadores celulares. Vários tipos de células não fagocíticas, incluindo fibroblastos, células da musculatura lisa dos vasos, células musculares cardíacas e células endoteliais, produzem EROs pela ação da NADPH oxidase para regular cascatas de sinalização intracelular (JONES et al., 1996). Esta produção de EROs é numericamente bastante inferior à dos fagócitos e se dá principalmente no meio intracelular. As vias de sinalização que utilizam as EROs como segundo-mensageiros incluem aquelas geradas pela ativação de inúmeros receptores de citocinas e fatores de crescimento. Fundamental para a sinalização redox é o mecanismo de formação de resíduos resultantes da interação das EROS, geralmente o H_2O_2 , com um tiol proteico. Por ser uma reação facilmente reversível, a oxidação do tiol se assemelha aos intermediários clássicos de sinalização criados pela fosforilação/desfosforilação de resíduos da tirosina, serina ou treonina (POOLE; KARPLUS; CLAIBONE, 2004).

Oxidantes como os radicais peróxido e hidroxila e o peróxido de hidrogênio induzem vários processos biológicos, tais como a expressão genética, estimulando componentes das vias de transdução de sinais, como o cálcio (Ca^{+2}) e a fosforilação de proteínas. Vários oxidantes aumentam a concentração citosólica de Ca^{+2} - que pode ser proveniente do retículo endoplasmático, do espaço extracelular, ou da mitocôndria - em resposta à influência dos oxidantes sobre as bombas, os canais e os transportadores de Ca^{+2} . Alternativamente, os oxidantes podem liberar o cálcio de suas proteínas transportadoras.

A fosforilação de proteínas, por sua vez, desempenha diversos papéis na transdução de sinal. As proteínas-alvo, incluindo enzimas, receptores, fatores de transcrição e elementos contráteis podem ser ativados ou inativados, de acordo com o estado de fosforilação de resíduos de aminoácidos específicos. O estado de fosforilação é ditado pela atividade de duas classes de enzimas, as proteínas-quinases (que mantêm as reações no sentido da fosforilação) e as proteínas fosfatases (que removem grupos fosfato). Muitas proteínas quinases e fosfatases têm ações específicas em relação a certos resíduos de aminoácidos; a maioria delas são serina/treonina quinases/fosfatases e tirosina quinases/fosfatase. A estimulação oxidante da fosforilação pode ser alcançada tanto pela ativação direta das proteínas quinases como pela

inibição das proteínas fosfatases. Da mesma forma, é possível que oxidantes inativem quinases e ativem fosfatases (SUZUKI; FORMAN; SEVANIAN, 1997).

Vários oxidantes estimulam a fosforilação de tirosina e de treonina/serina; a estimulação direta de proteína-quinases e a inibição de proteína- fosfatases por estes oxidantes parecem ser os mecanismos responsáveis. A estimulação por oxidantes de moléculas efetoras como a fosfolipase A2, assim como a ativação de fatores de transcrição responsivos ao estresse oxidativo, podem depender da ativação do Ca^{+2} sinalizador ou da fosforilação de proteínas. Além da estimulação da transdução de sinal pelos oxidantes, as interações entre ligantes e receptores produzem EROs, enquanto os antioxidantes bloqueiam a transdução do sinal mediada por estas espécies. Estas observações levaram à hipótese de que as EROs seriam o segundo-mensageiro para a ativação de fatores de transcrição, apoptose, reabsorção óssea, crescimento celular e quimotaxia (SUZUKI; FORMAN; SEVANIAN, 1997).

A transdução de sinal é o envio de uma mensagem ao núcleo da célula, que leva à transcrição genética. Normalmente os sinais para o aparato transcricional são transmitidos por uma classe de proteínas denominada fatores de transcrição, que se ligam a sequencias específicas do DNA, para regular a atividade da RNA polimerase. As EROs são capazes de modular vários fatores de transcrição nos mamíferos, como o fator de transcrição AP-1, que controla a expressão de mediadores do crescimento celular e o NF- κ B, importante regulador de lesões ateroscleróticas no sistema vascular (SUZUKI; FORMAN; SEVANIAN, 1997).

A alteração do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (ou estado redox) que acompanha a produção intracelular de EROs tem um papel primordial em transformar a ligação de receptores extracelulares em transcrição funcional. A ativação do NF- κ B pelas EROs é suficiente para resultar na produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 (MILLAR; PHAN; TIBBLES, 2007; NAIK; DIXIT, 2011), e a ativação deste fator nuclear por quase todos os estímulos pode ser bloqueada pela ação de antioxidantes, como a acetilcisteína, os tióis e a vitamina E (VALKO et al., 2007). O NF- κ B é uma proteína que se liga ao DNA e interage com genes alvo. Nas células em repouso, o NF- κ B encontra-se reprimido pela molécula inibitória I κ B, que ligada a ele, o mantém no citoplasma. A fosforilação do I κ B pela I κ B quinase libera o NF- κ B, permitindo sua translocação para o núcleo e a transcrição de inúmeros genes, mediadas por este fator. Nos fagócitos eles incluem aqueles para a IL-1, a IL-6, a IL-8, proteínas de fase aguda, moléculas de adesão e receptores de citocinas, entre outros. Está claro que muitas células, mas não todas, respondem ao dano oxidativo com a ativação do NF- κ B. Contudo, as bases moleculares desta regulação ainda são em grande parte

desconhecidas, assim como é desconhecida a razão para o fato da regulação do NF- κ B ser específica para o tipo celular (LI; KARIN, 1999).

Se as EROs ativam o NF- κ B e aumentam a expressão de citocinas e fatores de crescimento, a ligação destes últimos a uma série de receptores em células não fagocíticas, é capaz de gerar EROs. Citocinas como IL-1 β e TNF- α estão entre as primeiras reportadas como capazes de induzir a produção de EROs nestas células (CHAPPLE, 1997). As EROs provenientes desta interação entre citocinas e fatores de crescimento e seus respectivos receptores são capazes de agir como segundo-mensageiros e mediar importantes funções celulares, tais como a proliferação e a apoptose. O TGF- β também estimula a produção de EROs em uma variedade de células e tipicamente inibe o crescimento de maioria das células alvo (SHAW; COHEN; ALESSI, 1998). Ele também inibe a expressão de enzimas antioxidantes em algumas células.

Outro mecanismo através do qual as EROs participam na homeostase celular é o da sinalização do equilíbrio redox das células (ou sinalização redox), que acontece quando estas espécies reativas, eletronicamente ativadas, agem como mensageiros biológicos. Cada célula é caracterizada por uma particular concentração de elétrons (ou estado redox), armazenados em vários compartimentos intracelulares. O estado redox é determinado pela presença de agentes redutores (aqueles que tendem a ceder elétrons) e agentes oxidantes (aqueles que tendem a captar elétrons). O estado redox reflete o equilíbrio entre as taxas de produção e remoção de EROs e vai determinar vários aspectos do funcionamento celular. Em condições normais, o equilíbrio redox de uma célula é mantido dentro de limites estreitos, à semelhança do que ocorre com a manutenção do pH sanguíneo pelos sistemas biológicos. Em condições anormais, o estado redox pode ser alterado para valores maiores ou menores. Uma alteração de 30mV no estado redox significa uma alteração de 10 vezes na relação entre espécies redutoras e oxidantes na célula (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

O termo sinalização redox é utilizado, então, para descrever o processo regulatório no qual o sinal é constituído por reações de transferências de elétrons, ou reações redox, aquelas que ocorrem entre um oxidante e um redutor. Esta sinalização requer que o estado estável do equilíbrio redox seja ou esteja perturbado por um aumento na produção de EROs, ou por uma diminuição da ação de sistemas antioxidantes. Um aumento controlado da produção de espécies reativas leva a um desequilíbrio transitório, que representa a base fisiológica para a regulação redox e envolve uma mudança temporária do estado redox intracelular para uma condição mais oxidante. Em condições anormais, contudo, concentrações extremamente

elevadas de EROs podem levar a alterações permanentes na transdução do sinal, o que é típico em diversas enfermidades às quais as EROs estão associadas (GALTER; MIHM, DRÖGE, 1994; DRÖGE, 2002).

Apesar do papel preponderante como moléculas sinalizadoras no meio intracelular, as EROs também são importantes para a sinalização extracelular. Várias EROs, inclusive o peróxido de hidrogênio, são permeáveis à membranas, constituindo-se em excelentes candidatos a moléculas de sinalização parácrina, capazes de influenciar outras células à distância (BRYAN et al., 2012). As EROs produzidas pela NADPH oxidase também agem como segundo-mensageiros para sinais externos proliferativos e afetam positivamente a retroalimentação da NADPH oxidase, para regular a produção futura do radical peróxido (BRYAN et al., 2012).

A taxa de geração de EROs pelas mitocôndrias pode participar na detecção dos níveis de oxigênio pelo corpo carotídeo. A manutenção da homeostase do oxigênio é preservada nos organismos superiores por um rígido controle da massa de glóbulos vermelhos e da ventilação, mas estudos recentes demonstram a influência das EROs neste processo (VALKO et al., 2007).

O ciclo celular também é influenciado e caracterizado por flutuações no ambiente redox da célula, sendo a glutathione um importante mediador deste processo (ARRIGO, 1999; SCHAFER; BUETTNER, 2001; KERN; KEHRER, 2005). A glutathione tem papel importante na prevenção da apoptose, um dos desfechos possíveis do ciclo de vida celular. A depleção de glutathione, que torna o ambiente celular mais oxidante, foi relacionada ao desencadeamento da apoptose. Geralmente um ambiente mais redutor nas células (mantido por níveis mais elevados de glutathione e tioredoxina) estimula os processos proliferativos, enquanto uma leve tendência a um ambiente mais oxidante estimula a diferenciação celular. Um ambiente marcadamente oxidante nas células leva à apoptose e necrose das mesmas. Enquanto a apoptose é induzida por estímulos oxidantes moderados, a necrose é induzida por um intenso dano oxidativo (CAI; JONES, 1998; VOEHRINGER et al., 2000; EVENS, 2004).

O processo de morte programada, ou apoptose, é vital para o remodelamento dos tecidos e para a destruição de células que representem uma ameaça à integridade do organismo, e também está sob o controle das EROs. A decisão da célula de entrar em apoptose é baseada no equilíbrio entre a retirada de sinais positivos necessários para sua sobrevivência, tais como fatores de crescimento e citocinas, e a chegada de sinais negativos,

como, por exemplo, o aumento das concentrações de oxidantes nas células e o dano oxidativo ao DNA (HENGARTNER, 2000). Geralmente existem três diferentes mecanismos através dos quais a célula entra em apoptose; um é desencadeado por sinais internos e é conhecido como via intrínseca ou mitocondrial. O segundo é desencadeado por sinais externos e é conhecido como via do receptor de morte ou via extrínseca, e o terceiro é desencadeado pelo fator indutor de apoptose (AIF) (HALE et al., 1996). O mecanismo na qual as EROs estão envolvidas é o mecanismo intrínseco, que reflete o dano intracelular. Este dano causa ativação de uma proteína localizada nas membranas externas da mitocôndria, denominada Bel-2, que ativa uma proteína relacionada, a Bax, capaz de fazer buracos na membrana mitocondrial externa, desencadeando a ativação de uma série de outras proteínas, que culminam com a morte celular programada. (PHILCHENKOV et al., 2004).

2.3.13 O dano oxidativo aos cromossomos

Os cromossomos lineares são encapados por estruturas nucleoproteicas repetitivas, denominadas telômeros; a cada divisão celular estas estruturas sofrem progressivo encurtamento, e ao atingirem certo limite, promovem instabilidade genômica, senescência celular e apoptose.

Os telômeros são estruturas altamente sensíveis aos efeitos das EROs, devido ao seu alto teor de guanina, ocorrendo rápida redução de seu comprimento em situações de estresse oxidativo (KAWANISHI; OIKAWA, 2004). O irreversível encurtamento dos telômeros foi proposto como um marcador específico da exposição ao estresse oxidativo (HOUBEN et al., 2008; BALASUBRAMANYAM et al., 2010).

O dano oxidativo cumulativo ao DNA dá origem ao processo conhecido como senescência induzida por estresse, que expressa a cessação da atividade mitótica da célula induzida pelas EROs e a alteração de seu fenótipo. A senescência induzida por estresse, ao contrário da senescência replicativa, é independente do metabolismo do telômero, e geralmente limita o ciclo reprodutivo da célula a uma reduzida fração do que seria permitido pelo processo gradual de erosão dos telômeros.

A senescência resultante da perda e encurtamento dos telômeros após sucessivos ciclos de multiplicação celular é conhecida como senescência replicativa. A senescência replicativa, ou dependente do telômeros, não ocorre em culturas de células imortalizadas, dada a presença da telomerase, uma enzima que bloqueia a erosão dos telômeros. Ela ocorre, contudo, em células somáticas normais, que não possuem telomerase e está associada a enfermidades relacionadas ao envelhecimento e naquelas onde ocorre alta taxa de renovação celular. Com o envelhecimento, as moléculas que sofrem dano oxidativo se acumulam nas células pós-mitóticas e gradualmente prejudicam sua função até que sua multiplicação não seja mais possível. De qualquer forma, a despeito da causa da senescência, a cessação da mitose nas células é um evento irreversível (AIGNER et al., 2004).

2.3.14 O dano oxidativo aos lipídeos

A oxidação de lipídeos de membranas tem sido apontada como um dos eventos primários no dano oxidativo. Ela se perpetua em uma reação em cadeia, amplificando o potencial de dano causado por um evento iniciante. O papel do íon ferro na iniciação da reação recebeu bastante atenção, mas a progressão da reação ainda não foi devidamente estudada (NIKI et al., 1991).

Os íons de metais de transição estão envolvidos na peroxidação lipídica de duas maneiras. Eles participam do início da primeira reação, que envolve o ataque dos lipídeos por qualquer espécie reativa capaz de subtrair um átomo de hidrogênio. Esta espécie pode ser o radical hidroxila, de cuja síntese a partir do peróxido de hidrogênio e do radical superóxido os íons de metais pesados participam (HALLIWELL, 1991). Ainda, os íons de metais de transição participam da peroxidação lipídica pela decomposição de peróxidos; quando adicionados a sistemas lipídicos contendo peróxido, eles o decompõem em radicais peroxil e alkoxil, que, por sua vez, subtraem átomos de hidrogênio e perpetuam a reação (HALLIWELL, 1991).

A peroxidação lipídica causa danos diretos ao funcionamento das membranas celulares, diminuindo sua fluidez à medida em que aumentam a rigidez de sua estrutura, inativando enzimas associadas à ela e alterando sua permeabilidade aos íons cálcio (ORRENIUS et al., 1989). Os subprodutos da peroxidação lipídica, tais como o

malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HNE) podem causar dano a proteínas e ao DNA (ARUOMA, 1998). O MDA, produto final da peroxidação, é mutagênico para as células das bactérias e dos mamíferos e carcinogênico em ratos (VALKO et al., 2007). Os isoprostanos são uma série de compostos semelhantes à prostaglandina formados durante a peroxidação do ácido aracdônico, apesar de compostos semelhantes serem formados a partir de outros ácidos graxos poli-insaturados. Estes compostos podem ser medidos no plasma e na urina, mesmo em indivíduos normais, indicando que a peroxidação lipídica ocorre fisiologicamente (ARUOMA, 1998).

2.3.15 O dano oxidativo às proteínas

O dano oxidativo às proteínas, *in vivo*, pode afetar a função de receptores, enzimas, proteínas transportadoras e até gerar novos antígenos, capazes de provocar respostas imunes. Os produtos do dano oxidativo às proteínas podem contribuir para o dano secundário a outras biomoléculas, assim como a inativação de enzimas reparadoras do DNA e perda da fidelidade das DNA polimerases na replicação do DNA pode afetar estas moléculas vitais. As reações químicas que resultam do ataque das EROs sobre as proteínas são complexas e geram radicais a partir de resíduos de aminoácidos, sendo que os elétrons podem ser transferidos entre os diferentes aminoácidos (ARUOMA, 1994).

A concentração de qualquer um destes radicais gerados, ou preferencialmente a combinação de alguns deles, pode ser utilizada como medida do equilíbrio entre dano oxidativo e reparação ou remoção hidrolítica das proteínas danificadas (ARUOMA, 1998).

O ensaio do carbonil é uma medida geral do dano oxidativo às proteínas em tecidos e fluidos corpóreos (REZNICK; PACKER, 1994). Ele se baseia no fato de que várias EROs podem atacar resíduos de histidina, arginina, lisina e prolina nas proteínas e produzir grupos carbonil, que são mensuráveis após reagirem com a 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) (ARUOMA, 1994). A concentração de grupos carbonil, gerada por vários mecanismos, é uma boa medida da oxidação proteica mediada pelas EROs (VALKO et al., 2007).

2.3.16 O dano oxidativo à mitocôndria

Quantitativamente, a mitocôndria é o sítio celular mais importante no que se refere à produção de O_2^- e H_2O_2 , nos tecidos dos mamíferos. A concentração de O_2^- na matriz mitocondrial é de 5 a 10 vezes maior do que a encontrada nos compartimentos nuclear e citosólico, determinando a exposição dos componentes mitocondriais a um alto fluxo destes radicais.

O DNA mitocondrial é um alvo sensível para o ataque das EROs, por estar em estreita proximidade com os locais de produção de EROs e desprotegido pela ausência de histonas e de uma membrana nuclear, além de possuir baixa capacidade de reparação. A oxidação das bases do DNA mitocondrial pelas EROs excede em 10 a 20 vezes aquela do DNA nuclear (RICHTER; PARK; AMES, 1988; AMES, 1989; ADACHI; ZEISIG; MÖLLER, 1995; AMES; SHIGENAGA; HAGEN 1995; RICHTER et al., 1995). Adicionalmente, as EROs são responsáveis também pela quebra das fitas simples deste DNA.

Existem dois locais de produção de H_2O_2 na mitocôndria, a membrana interna e a membrana externa. A produção de EROs pela membrana mitocondrial interna encontra-se associada à transferência de elétrons na cadeia respiratória, e está na dependência do estado metabólico (ou de ativação) da mitocôndria. Em adição ao estado metabólico da mitocôndria, a disponibilidade de ADP, a pressão parcial de O_2 e o NO modulam a produção de EROs. (BOVERIS; CHANCE, 1973; PODEROSO et al., 1996). A geração de radicais peróxido e de peróxido de hidrogênio pela cadeia respiratória, em estreita proximidade com os reservatórios de cobre e ferro das membranas mitocondriais, fornece as condições necessárias para a ocorrência da reação de Fenton, levando à formação do radical hidroxila (CADENAS; DAVIES, 2000).

A alta taxa de produção de O_2^- na membrana mitocondrial interna está em relação funcional com a localização de SOD (MnSOD) na matriz mitocondrial. A taxa de produção e liberação de O_2^- na matriz e a atividade da MnSOD determinam uma concentração estável de O_2^- (BOVERIS; OSHINO; CHANCE, 1972; BOVERIS; CADENAS, 1975). A atividade da glutathione peroxidase é igualmente importante e excede a de outros ligantes do peróxido de hidrogênio na mitocôndria (FLOHÉ; HECHT; STEINERT, 1999).

A membrana externa da mitocôndria é o segundo sítio de produção de EROs, que se dá pela ação da enzima monoamino oxidase sobre as aminas que a constituem. O peróxido de hidrogênio gerado durante a oxidação das aminas biogênicas parece ser um metabólito central, que contribui em diversas reações bioquímicas para o dano oxidativo da matriz mitocondrial, dada a sua alta capacidade de difusão e longa vida. A contribuição do H_2O_2 gerado por este mecanismo é frequentemente subestimada, mas pode ter sérias implicações para o estado redox da célula, e particularmente, da mitocôndria. Esta contribuição é potencializada pelo fato da membrana mitocondrial ser impermeável à catalase, que poderia reduzir o dano oxidativo caso presente, evitando a quebra de fitas simples de DNA (CADENAS; DAVIES, 2000).

A exposição da mitocôndria ao estresse oxidativo pode induzir à uma série de respostas que vão de aumento na taxa de mitose a parada transitória do crescimento, parada permanente do crescimento, apoptose e necrose (DAVIES, 1999). Durante a apoptose induzida por EROs há evidências de degradação do RNA ribossômico, do RNA mensageiro e também do DNA mitocondrial (CRAWFORD et al., 1997a,b; CRAWFORD; ABRAMOVA; DAVIES, 1998; ABRAMOVA; DAVIES; CRAWFORD, 2000). A hipótese atual é que o dano oxidativo cause um influxo de cálcio para o interior da mitocôndria, que ativa uma nuclease mitocondrial, promovendo a degradação indiscriminada de todos os polinucleotídeos mitocondriais.

Apesar de uma parte do O_2^- e do H_2O_2 gerados pelo transporte de elétrons poder se difundir da mitocôndria para causar dano a componentes celulares mais distantes, os efeitos do radical hidroxila são largamente controlados por sua incapacidade de difusão, alta reatividade e curta meia-vida, fazendo com que os efeitos destas três EROs sejam maiores na membrana mitocondrial interna, onde são gerados. Finalmente, na membrana interna estão concentrados complexos de ferro e cobre, que podem catalisar reações posteriores do O_2^- e do H_2O_2 , capazes de danificar proteínas da mitocôndria (ZHANG et al., 1990).

Trabalhos recentes, contudo, sugerem cautela na associação da disfunção mitocondrial com o dano oxidativo (WANG et al., 2001; KUJOTH et al., 2005; TRIFUNOVIC et al., 2005; JANG; REMMEN, 2009; MURPHY, 2009).

2.3.17 Métodos para a avaliação do estresse oxidativo

Considerando o estresse oxidativo como um desequilíbrio entre as concentrações de oxidantes e antioxidantes, métodos para quantificá-lo incluem medidas diretas ou indiretas destas substâncias. Dada sua alta reatividade, a quantificação dos oxidantes e de alguns antioxidantes requer equipamento especializado e considerável experiência. Os processos de oxidação e redução podem ser monitorados, *in situ*, pela ressonância de spin de elétrons, mas este não é um método adequado para análises de rotina. Ao invés disto, métodos de medida indireta de oxidantes utilizando o corante fluorescente diclorofluoresceína são uma alternativa simples, apesar de relativamente não específica. A reação com oxidantes pode ser quantificada através do uso de uma placa de leitura de fluorescência ou através da citometria de fluxo.

Medidas de antioxidantes podem ter como objetivo estimar a capacidade antioxidante geral de um sistema ou determinar precisamente a concentração de antioxidantes específicos. Ensaios para a determinação da capacidade antioxidante total incluem os ensaios colorimétricos: estado antioxidante total (TAS), capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), parâmetro antioxidante de captação de radicais (TRAP) e potencial redutor e antioxidante férrico (FRAP). Uma característica comum destes ensaios é a tentativa de resumir a atividade de todos os sistemas antioxidantes em um único valor e de estarem disponíveis em *kits* comerciais (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007). A capacidade antioxidante total (TAC) é um destes ensaios. A TAC é mais do que uma simples determinação analítica, e considera não somente a participação dos sistemas antioxidantes clássicos, mas também a de pró-oxidantes e antioxidantes ainda não bem definidos até o presente momento, na função de manter o equilíbrio redox (GHISELLI et al., 2000). Ela pode, assim, servir como auxiliar para a detecção, *in vivo*, de alterações relacionadas à ocorrência de estresse oxidativo, que não sejam observáveis através de análises específicas e isoladas de sistemas antioxidantes (GHISELLI et al., 2000).

As medidas mais específicas de antioxidantes incluem as dosagens das concentrações do ascorbato, da glutathione peroxidase e do α -tocoferol. Métodos específicos baseiam-se em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), enquanto testes mais simples e menos sensíveis empregam técnicas de espectrofotometria. A maior desvantagem deste último tipo

de análise é o risco de auto-oxidação da amostra após a obtenção, levando a uma superestimação do estresse oxidativo (LYKKESFELDT, 2002).

Ainda entre os sistemas antioxidantes enzimáticos, podemos verificar a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, por métodos colorimétricos (JOHANSSON; BORG, 1988; SUN et al., 1988).

As medidas do dano oxidativo têm se concentrado, tipicamente, sobre as três macromoléculas mais diretamente afetadas por ele: o DNA, as proteínas e os lipídeos. A quantificação do dano oxidativo ao DNA é geralmente feita por dois métodos. O primeiro é o ensaio COMET, que usa a eletroforese de gel para pesquisar semi quantitativamente o número de fitas de DNA quebradas em cada célula (COLLINS, 2004). O outro método envolve a quantificação de nucleotídeos e nucleosídeos oxidados por HLPC ou espectrometria de massa.

A medida da oxidação de proteínas é um processo bem mais simples, comumente utilizado como medida do dano oxidativo, apesar de alguns resultados ambíguos. Dada a sua formação precoce, sua grande estabilidade e duração prolongada, os produtos de oxidação das proteínas têm sido empregados como biomarcadores, no lugar dos marcadores de peroxidação lipídica (MASSY; NGUYEN-KHOA, 2002; DALLE-DONNE et al., 2003) A oxidação das proteínas é frequentemente pesquisada através da presença de grupos carbonil, que são o resultado da oxidação de aminoácidos mediada por radicais livres não específicos. Vários testes existem para este fim. Os métodos aplicados para esta identificação são colorimétricos, a maioria com limitada especificidade. Na maioria dos casos, um homogenato ou fração microsomal reage com a dinitrofenilhidrazina (DNPH), um composto que forma um derivativo de forte absorbância, ao reagir com grupos carbonil (DALLE-DONNE et al., 2003). O aumento da absorbância a 370 nm é interpretado como um indicador do aumento da oxidação proteica. Métodos mais sofisticados para este fim já estão disponíveis, mas requerem caros equipamentos e geralmente tem baixa sensibilidade, uma vez que apenas algumas, dentre as inúmeras modificações nos aminoácidos, são quantificadas. O método espectrofotométrico do DNPH é útil para quantificar grupos carbonil no plasma, homogenatos tissulares, extratos celulares ou proteínas isoladas.

Os lipídeos, em particular os poli-insaturados, são predispostos aos processos de oxidação. A ocorrência de oxidação lipídica pode ser pesquisada de várias maneiras, mas dois grupos de ensaios se destacam nesta tarefa, o do malondialdeído (MDA) e o do isoprostano. O MDA é um subproduto frequentemente quantificado como medida dos hidroperóxidos de

lipídeos, dando origem ao termo peroxidação lipídica para a designação de seu processo de formação. O ensaio de MDA envolve a reação com o ácido tiobarbitúrico, seguida da determinação espectrofotométrica (ESTERBAUER; ZOLLNER, 1989), e é frequentemente denominado de ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este ensaio tem baixa especificidade e é sujeito à formação de artefatos, uma vez que apenas uma fração do MDA é gerada *in vivo*. Ainda mais, o MDA pode ser gerado *in vivo* por outros processos que não a peroxidação lipídica. Apesar destas considerações, o método permanece como um dos mais úteis e mais frequentemente empregados para aferir o dano oxidativo em função de sua simplicidade. Na verdade, o ensaio do MDA demonstrou ser um dos melhores preditores do dano oxidativo e geralmente mostra excelente correlação com outros marcadores, como o isoprostano, que é considerado como o mais confiável, em relação à peroxidação lipídica (MORROW; ROBERTS, 2000). Originalmente os ensaios do isoprostano requeriam equipamento de espectrometria de massa, limitando seu uso, mas hoje em dia testes de ELISA já estão comercialmente disponíveis.

2.4 O ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE OS COMPONENTES ARTICULARES

As espécies reativas do oxigênio não são apenas agentes deletérios, capazes de provocar dano oxidativo aos componentes da MEC e degradação da cartilagem articular. As EROs são, também, fatores integrantes fundamentais dos mecanismos de sinalização intracelular dos condrócitos e de regulação dos processos inflamatórios sediados na cartilagem. Quando produzidas pelos condrócitos em baixas concentrações, modulam a expressão genética, estimulam os processos anabólicos e antioxidantes, e participam do controle de várias funções celulares, contribuindo para a manutenção da homeostase da cartilagem articular. Em contraste, no curso das enfermidades articulares são produzidas em concentrações que ultrapassam a capacidade de detoxificação das células, tornando-se deletérias (HENROTIN; BRUCKNER; PUJOL, 2003). Consideraremos, a seguir, estes dois espectros de ação das EROs sobre os componentes articulares, ou seja, sua participação em situações fisiológicas ou quando da ocorrência de enfermidades articulares.

A despeito da enfermidade em questão, OA ou OC, os efeitos do estresse oxidativo sobre os componentes articulares serão descritos de forma comum. Apesar de diferirem em

etiologia, estas enfermidades articulares comprometem os componentes articulares indistintamente, e refletem um desequilíbrio na homeostase intra-articular. Resultam, ao final de seu curso, em destruição destes constituintes e perda das funções articulares, com prejuízo à movimentação (DE GRAUW, 2011a; CHIARADIA et al., 2012). Quando apropriado, distinções e particularidades serão apresentadas.

Estima-se que a disponibilidade de oxigênio varie de 6% na zona superficial da cartilagem, próxima ao líquido sinovial, para 1 a 2% na zona profunda, ou interface subcondral. Assim, os condrócitos são células bem adaptadas à hipóxia, produzindo a maior parte de sua fonte de energia química, o ATP, através da glicólise (URBAN, 1997). A adaptação dos condrócitos à hipóxia também é evidente na sua baixa densidade de mitocôndrias, que neles representam de 1 a 2% do volume celular, quando comparada aos 15 a 20% presentes nos outros tipos celulares.

Ao mesmo tempo em que se encontram adaptados a sobreviver em um ambiente hipóxico, os condrócitos são extremamente sensíveis às variações da tensão de oxigênio. Estas variações afetam a síntese de proteoglicanos (YSART; MASON, 1994; URBAN, 1997; GRIMSHAW; MASON, 2000), a expressão de fatores de crescimento (ETHERINGTON et al., 2002), a captação de glicose (MOBASHERI et al., 2005; HEYWOOD; BLADER; LEE, 2006) e os níveis de ATP (STEFANOVIC-RACIC et al., 1994; URBAN, 1997). Oscilações na tensão de oxigênio também se mostraram capazes de influenciar a produção de mediadores inflamatórios em resposta à compressão mecânica, em explantes de cartilagem, (FERMOR et al., 2004b; FERMOR et al., 2005; HASHIMOTO et al., 2006) e a taxa de reposição da MEC, afetando as propriedades materiais da cartilagem (FERMOR et al., 2004a; LEDDY; GUILAK, 2008).

Os condrócitos são, ainda, altamente sensíveis à ação de forças mecânicas. As EROs geradas por demandas mecânicas excessivas podem influenciar o crescimento da cartilagem e a resposta à injúria, através da modulação das defesas antioxidantes, entre vários outros processos celulares. Os condrócitos produzem EROs em resposta à estímulos mecânicos, de maior ou menor intensidade, como compressão mecânica intermitente e forças de cisalhamento. Apesar de avanços, as repercussões das EROs produzidas nestas circunstâncias, sobre a biologia da MEC, não são completamente conhecidas (TOMIYAMA et al., 2007). Sabe-se, contudo, que todos os componentes celulares serão afetados pela produção de EROs (LAURINDO et al., 1997; SUTIPORNPALANGKUL et al., 2009; ZISKOVEN et al., 2010; RAMAKRISHNAN; BROUILLETTE; MARTIN, 2013) e que elas poderão determinar a

disfunção articular, como evento final, caso suas ações não sejam antagonizadas pelos sistemas de defesa antioxidante. Estudos realizados *in vitro* mostraram um explosivo aumento na geração de EROs após um impacto único, resultando em 60% de morte de células articulares, indicando que o trauma mecânico pode levar a níveis letais de EROs para os condrócitos (MARTIN et al., 2009). Uma das hipóteses a respeito da instalação da OA sugere que os danos mitocondriais sejam acelerados pelo estresse oxidativo induzido pelo trauma articular.

Outro aspecto da sensibilidade do condrócito à ação de forças mecânicas é revelado pela observação de que o exercício moderado leva a uma produção de concentrações mais baixas de EROs, e a uma cartilagem mais saudável (RADAK Z et al., 2008). Níveis não deletérios de EROs, gerados por estímulos mecânicos, condicionam a cartilagem, ativando vias bioquímicas específicas que aumentam a capacidade antioxidante intracelular, a síntese e o metabolismo da MEC. Estes níveis subletais de EROs suprimem a inflamação e tornam os condrócitos mais resistentes ao dano oxidativo (RAMAKRISHNAN et al., 2010; RAMAKRISHNAN; BROUILLETTE; MARTIN, 2013). No entanto, os condrócitos serão negativamente afetados no caso de produção excessiva de EROs. Elas afetam negativamente a estrutura e o metabolismo da cartilagem, geram fissuras, delaminação e rupturas, tornando os condrócitos susceptíveis à ação de fatores mecânicos (RAMAKRISHNAN; BROUILLETTE; MARTIN, 2013). O condrócito, como único elemento celular da matriz cartilaginosa está no centro destes eventos.

Condrócitos articulares normais são capazes de produzir e liberar peróxido de hidrogênio. Fisiologicamente, a geração de EROs é necessária para a manutenção da estrutura normal da MEC. No entanto, quando há produção excessiva destas espécies reativas, como no caso das artrites, o condrócito pode encontrar-se envolvido na degradação dos componentes MEC (TIKU; LIESCH; ROBERTSON, 1990). A maioria das EROs produzidas nos condrócitos provém da mitocôndria, sugerindo seu papel potencial na transdução mecânica, em condições fisiológicas ou não (MARTIN et al., 2009; GOODWIN et al., 2010). A origem mitocondrial das EROs foi confirmada pelo decréscimo de sua produção e diminuição da morte celular em explantes de cartilagem danificada tratados com rotenona, um inibidor do complexo enzimático I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (GOODWIN et al., 2010). Estes estudos não só confirmam a origem mitocondrial das EROs e seu papel deletério, mas também respaldam o uso de terapias antioxidantes como uma opção válida de tratamento para o trauma articular (RAMAKRISHNAN; BROUILLETTE; MARTIN, 2013).

Apesar de níveis aumentados de EROs serem deletérios e estarem implicados no processo de envelhecimento e na patogenia da OA, a produção de energia nos condrócitos depende da disponibilidade destas espécies reativas para a produção de ATP (LEE; URBAN, 2002; MARTIN et al., 2012). Os oxidantes derivados da mitocôndria servem de substrato para a manutenção da função glicolítica. Contudo, quando ocorre o dano mitocondrial, associado ao envelhecimento e/ou à desarticulação da cadeia transportadora de elétrons, ocorre a liberação de EROs da mitocôndria e o prejuízo na produção de ATP pelo condrócito, expondo as células a maior dano oxidativo (GOLDEN; MELOV, 2001). O resultado final destas alterações é irreversível e força a mitocôndria a iniciar a apoptose ou o processo de senescência replicativa (TOUSSAINT; MEDRANO; ZGLINICKI, 2000).

O aumento significativo da concentração de EROs, ou estresse oxidativo, contribui para o desequilíbrio entre os eventos anabólicos e catabólicos na cartilagem e resulta em dano oxidativo a seus componentes (LOESER, 2008; HENROTIN; BRUCKNER; PUJOL, 2003). As EROs fazem isto através de vários mecanismos, entre eles a inibição da síntese e estímulo à destruição da MEC (LI; XIE; WANG, 2012) e a degradação do ácido hialurônico (YAMAZAKI et al., 2003). Potencializando as ações das EROs, está a capacidade do H_2O_2 de estimular a cicloxigenase e a consequente produção de tromboxana, prostaciclina e prostaglandina (PANGANAMALA et al., 1974; TAYLOR; MENCONI; POLGAR, 1983). Existe ainda a possibilidade da geração de prostaglandinas, *in vivo*, por sistema não enzimático, envolvendo a ação direta das EROs sobre o ácido aracdônico (MORROW et al., 1990).

Como visto anteriormente, os sinoviócitos também participam do desenvolvimento e da progressão da OA e vários estudos demonstram que, no contexto da enfermidade, as células sinoviais são ativadas por citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que seu papel seja até mais importante do que o dos condrócitos na geração de EROs (SCHNEIDER et al., 2005). As EROs desempenham papel importante na sinalização intracelular dos processos inflamatórios da membrana sinovial (HENROTIN; BRUCKNER; PUJOL, 2003). Em adição à ativação do NF- κ B, elas foram implicadas nas respostas inflamatórias do endotélio vascular da membrana sinovial e das células de revestimento do tipo A.

Poucos estudos analisaram a produção de EROs como modeladores do osso subcondral (ZHOU; CUI; URBAN, 2004), mas seu envolvimento na patogenia da OA é certo. Em estágios avançados da afecção, alterações da ossatura subcondral ocorrem e se manifestam nos exames de imagem, tais como esclerose óssea (HILAL et al., 1998) e

formação de osteófitos. Mais tardiamente, a ativação de osteoclastos levará à reabsorção óssea, com possível formação de cistos ósseos, que podem afetar a estrutura de suporte peri articular (BURR, 2004).

A despeito do tipo celular responsável pela síntese de EROs, estas espécies, uma vez produzidas, acabam por se difundir livremente por todos os compartimentos articulares, devido à compressão cíclica que ocorre durante as passadas, afetando indistintamente a todos. As flutuações no líquido sinovial e a expulsão do líquido da MEC durante as fases de pressão estática causam um constante intercâmbio entre fluido do compartimento sinovial e do tecido cartilágneo (LAURINDO et al., 1997; WONG; CARTER, 2003; ZISKOVEN et al., 2010), amplificando os efeitos destas moléculas.

As evidências de estresse oxidativo aumentado em portadores de OA advêm de inúmeros estudos identificando o incremento da produção de EROs, a maior susceptibilidade à ação de oxidantes pela diminuição dos sistemas antioxidantes de defesa contra os radicais livres e o aumento de marcadores indicativos da ocorrência de dano oxidativo nestes indivíduos (MANEESH et al., 2005; AFONSO et al., 2007; MOHAN SURAPANENI; VENKATARAMANA, 2007; OSTALOWSKA et al., 2007; REGAN et al., 2008).

Nos equinos, o número de estudos ainda é reduzido, especialmente tendo em vista o impacto das enfermidades articulares na espécie. Um estudo utilizando o modelo de indução de sinovite por carragenina não foi capaz de determinar diferenças significativas entre o estresse oxidativo nas articulações induzidas e as controle, injetadas com salina. A hipótese inicial de que o número expressivo de células fagocíticas atraídas para as articulações inflamadas fosse fonte geradora de radical superóxido, como resultado da explosão respiratória, não se confirmou. Contudo, a ausência de ensaios quantitativos para o estresse oxidativo, na época, limitou a análise dos resultados (AUER; NG; SEAWRIGHT, 1993).

Dimock, Siciliano e McIlwraith (2000) examinaram o papel das EROs na doença articular equina, comparando o conteúdo de proteína carbonil, como marcador de estresse oxidativo no líquido sinovial, em articulações com histórico de OA aguda ou OC, com aquele de articulações normais. Nos dois casos de enfermidade articular, o conteúdo de proteína carbonil apresentou-se elevado, evidenciando a participação do estresse oxidativo em ambas afecções. Estes autores também verificaram uma tendência ao incremento dos sistemas antioxidantes nas articulações portadoras de enfermidades. Daix et al. (2007) também

verificaram a ocorrência de estresse oxidativo em articulações de equinos afetadas pela OA, através da detecção de marcadores de peroxidação lipídica e proteica.

Adicionalmente, na cartilagem equina degradada, a percentagem de condrócitos apoptóticos mostrou-se elevada e a ocorrência de apoptose apresentou-se colocalizada com áreas de coloração para nitrosaminas (KIM et al., 2003), refletindo a participação do NO no processo de morte celular. A coloração para nitrosaminas também foi utilizada em outro estudo e apresentou-se significativamente aumentada na ossatura subcondral de cavalos portadores de OA, quando comparada com a de animais controles (VAN DER HARST et al., 2006).

Apesar de serem agentes capazes de interferir negativamente na estrutura e função de várias macromoléculas no ambiente intra-articular, o papel mais significativo das EROs vai além do simples dano direto que causam às células e às componentes da MEC, membranas e ácidos nucleicos. As EROs, em concentrações subtóxicas, participam na regulação de vias de sinalização intracelulares específicas, que controlam processos anabólicos e catabólicos na articulação, e os desequilíbrios redox podem comprometer, desastrosamente, o equilíbrio entre eles (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

2.4.1 As EROs nas vias de sinalização do condrócito

As EROs estão envolvidas de maneira significativa no controle de muitas funções fisiológicas dos condrócitos, incluindo a transcrição de sinais, a regulação de seu metabolismo, sua expressão genética e, portanto, a homeostase da MEC. Em algumas situações observaram-se efeitos anti-inflamatórios associados às EROs, relacionando sua ocorrência a uma eficiente sinalização ou ao reconhecimento imunológico de componentes artrogênicos e a efeitos inibitórios sobre mediadores inflamatórios em condições específicas (HENROTIN; BRUCKNER; PUJOL, 2003). Em baixas concentrações, as EROs são sinalizadores intracelulares, segundo-mensageiros, envolvidos na regulação de uma série de produtos de expressão genética, como citocinas e MMPs (HENROTIN; KURZ; AIGNER, 2005).

As duas vias de sinalização redox, ativação das quinases e inativação das fosfatases, participam na sinalização de fatores de crescimento, citocinas e integrinas no condrócito. Existem evidências de que as EROs ativam vias catabólicas (como a estimulação das integrinas pelos fragmentos de fibronectina) e também vias anabólicas (como a estimulação da IGF-1), e que o aumento significativo do nível de EROs ativa a sinalização catabólica e inibe a sinalização anabólica (LOESER, 2008). Estes efeitos seletivos da produção excedente de EROs nas vias de sinalização são os responsáveis pelo desequilíbrio entre as atividades anabólicas e catabólicas, contribuindo para a progressão da OA.

As EROs participam também da sinalização intracelular no processo de hipertrofia e diferenciação dos condrócitos durante a ossificação endocondral (ADAMS; COHEN; LASSOVÁ, 2007). A atividade de segundo-mensageiro das EROs é necessária para a transdução do sinal de diferenciação do condrócito (KIM et al., 2010; LIU et al., 2014) e, portanto, para o sucesso da transformação do molde cartilágneo em osso e para o crescimento dos ossos longos. A perturbação do processo de ossificação endocondral é que define a instalação da OC e evidências do envolvimento das EROs neste processo são fornecidas pelo estudo de Morita et al. (2007). Estes autores demonstraram níveis aumentados de EROs em condrócitos hipertróficos, e, ainda, que o tratamento com antioxidantes foi capaz de bloquear tanto a hipertrofia como a proliferação destes condrócitos. Os efeitos deletérios da produção excessiva de EROs sobre os processos de diferenciação são abrandados pela ação da SOD ou seja, pela manutenção do equilíbrio entre oxidantes/antioxidantes na cartilagem, implicando definitivamente as EROs nas perturbações destes processos (LIU et al., 2014).

Se as EROs tem papel fundamental na condição de segundo-mensageiros, condições onde a produção de EROs mitocondriais estejam diminuídas significam prejuízo desta função. Isto foi demonstrado em estudo com condrócitos articulares de equinos submetidos a condições de hipóxia, onde a produção de EROs mitocondrial foi inibida. Nesta situação, onde ocorreram baixas tensões de oxigênio, houve prejuízo da função sinalizadora das EROs e da capacidade de sobrevivência dos condrócitos, à semelhança do que se verifica nos estados inflamatórios crônicos (MILNER et al., 2006). Futuras investigações são necessárias para desvendar o fino equilíbrio entre concentrações sinalizadoras e regulatórias de EROs daquelas nocivas à homeostase da cartilagem articular (HENROTIN; BRUCKNER; PUJOL, 2003).

2.4.2 As EROS e a senescência e morte do condrócitos

O condrócito é uma célula quiescente, desprovida de expressiva capacidade de renovação. Assim sendo, a instalação das características de senescência (diminuição do metabolismo e suspensão do ciclo replicativo) contribui para a progressão da OA, dado que estas células entram rapidamente em apoptose e não sendo repostas, subtraem a matriz de seu único elemento celular, regulador e provedor.

A cartilagem articular é particularmente vulnerável aos efeitos da senescência celular. Quando a maturidade esquelética é atingida, a calcificação subcondral isola o tecido cartilágneo do sistema vascular, de sorte que novas células não tem acesso à cartilagem madura, impedindo a reposição dos elementos celulares perdidos ou senescentes. A senescência progressiva (replicativa e induzida por estresse) numa população limitada de células altamente diferenciadas, adaptadas às condições de baixas tensões de oxigênio e com baixo nível de atividade metabólica, torna a manutenção e o remodelamento deste tipo de tecido cada vez mais difíceis (AIGNER et al., 2004).

Foi demonstrado em condrócitos humanos, que as EROS são capazes de induzir instabilidade genômica, incluindo instabilidade telomérica, ou seja, que são capazes de causar a senescência dos condrócitos. A senescência dos condrócitos é diretamente associada com o encurtamento dos telômeros, evento conhecido como disfunção telomérica (MARTIN; BUCKWATER, 2001), no qual as EROs estão diretamente implicadas (YUDOH et al., 2005). O tratamento com agentes antioxidantes de condrócitos submetidos a estresse oxidativo em cultura resultou em tendência a aumentar o comprimento dos telômeros e estender seu período de vida replicativa (BRANDL et al., 2011). Por sua vez, o encurtamento dos telômeros resultante da exposição as EROs está fortemente correlacionado com a AO, na cartilagem de pacientes humanos acometida pela enfermidade (HARBO et al., 2012).

Apesar da maioria dos autores assumirem como verdadeiro que a atividade mitótica do condrócito raramente ocorre após a maturidade esquelética (BUCKWALTER; MANKIN, 1997a; BUCKWALTER; MANKIN, 1997b), alguma divisão celular tem lugar, particularmente após a injúria celular (BUCKWALTER; MANKIN, 1997b). Assim, as sobrecargas mecânicas intensas e repetitivas sobre a articulação, ou o trauma articular, poderiam estimular a divisão celular, acelerando suficientemente a erosão dos telômeros e promovendo a senescência mais precocemente (BUCKWALTER; LANE, 1997). As reduções

focais no comprimento dos telômeros frequentemente ocorrerem em áreas expostas a trauma repetitivo, ou que sejam sítios de alterações degenerativas, e em extensão suficiente para influenciar a integridade genômica (PRICE et al., 2002). Invariavelmente, condrócitos de articulações afetadas por OA apresentam um fenótipo senescente, com baixo índice mitótico, respostas deficientes ao TGF- β e à IL-1, com síntese de matriz anormal e expressão aumentada de β -galactosidase (MARTIN; BUCKWALTER, 2002; ZHOU; CUI; URBAN, 2004). Em culturas de condrócitos de pacientes humanos acometidos por OA, as EROs induziram características de senescência precoce. Isto demonstra que a senescência não decorre exclusivamente de processos replicativos, e pode independer das disfunções teloméricas, associadas à progressão da idade. A senescência pode ocorrer associada ao aumento da produção de EROs, a despeito do fator causador, e neste caso é conhecida como senescência prematura induzida pelo estresse (SIPS) (DAI et al., 2006).

Os condrócitos da cartilagem afetada por OA exibem dano significativo de seu DNA, o que acarreta a apoptose (BLANCO et al., 1998a; HASHIMOTO et al., 1998; KIM et al., 2000; AIGNER et al., 2001; DAVIES et al., 2008) ou sua permanência em um fenótipo pré apoptótico, com um padrão descoordenado de expressão genética. Este padrão desorganizado pode comprometer a capacidade das células de manter a homeostase, fazendo com que percam sua capacidade proliferativa após algumas poucas divisões em cultura, caracterizando a senescência replicativa (MARTIN; BUCKWATER, 2001). A cartilagem afetada pela OA tem maior incidência de dano ao DNA do que a cartilagem sadia e a quebra das fitas de DNA e as modificações de bases induzidas pelo estresse oxidativo podem ser inibidas pela SOD (DAVIES et al., 2008). O estresse oxidativo aumentado em pacientes idosos os tornam mais susceptíveis à morte celular pelo dano oxidativo, também através da disfunção do sistema antioxidante da glutathione (DEL CARLO; LOESER, 2003). Na OA, os condrócitos apresentam não só alterações nucleares condizentes com a morte celular apoptótica, mas também alterações citoplasmáticas (BLANCO et al., 1998a) e esta resposta tem sido implicada na patogenia da enfermidade (CLEGG; MOBASHERI, 2003).

A maior incidência de apoptose na cartilagem afetada pela OA é responsável pela diminuição da celularidade do tecido e se relaciona com a idade do paciente e a severidade da lesão. Uma vez que a cartilagem não possui fagócitos mononucleares, as células mortas, ou corpos apoptóticos, não são removidos e permanecem em lacunas. Nestas lacunas, os corpos apoptóticos se desintegram e liberam seu conteúdo, contribuindo para a degradação e mineralização da MEC (KÜHN et al., 2004).

O NO, a caspase-3 e a tirosina-quinase foram identificados como indutores da apoptose nos condrócitos (BLANCO; GENG; LOTZ, 1995; KIM et al., 2003). O NO não pode, de forma independente, induzir a apoptose dos condrócitos e requer uma espécie de cofator. Curiosamente, foi verificado que quando as concentrações de antioxidantes nos condrócitos da cartilagem afetada pela OA era muito baixa, eles apresentavam marcada resistência à apoptose e que o NO só era capaz de induzir a apoptose na presença de EROs (DEL CARLO; LOESER, 2002). A resposta apoptótica da cartilagem articular ao estresse mecânico também parece ser mediada pelas EROs (KURZ et al., 2004).

Nos equinos, de maneira similar, a ocorrência de apoptose aumenta significativamente, de acordo com o grau de severidade da OA; ela é mais frequentemente observada na zona superficial do que nas zonas intermédia e profunda da cartilagem e se correlaciona com achados macroscópicos precoces de dano à cartilagem (THOMAS et al., 2011a). Nos equinos, ainda, a prevalência da apoptose parece estar relacionada com o tipo específico de articulação acometida pela OA, sendo significativamente mais alta nas articulações metacarpo falangeanas, do que nas articulações interfalangeanas proximal e distal (THOMAS et al., 2011b).

As mitocôndrias são organelas reguladoras centrais da apoptose, e alterações estruturais nestas organelas estão relacionadas a diversas etapas e características do processo de morte celular (KÜHN K et al., 2004). Nos condrócitos da zona hipertrófica da cartilagem de crescimento, bem como naqueles da cartilagem acometida por OA, a funcionalidade da mitocôndria está comprometida, e desempenha papel central no evento de morte celular (KÜHN et al., 2004. MARTIN et al., 2012).

2.4.3 As Eros e o dano mitocondrial no condrócito

O dano ao DNA mitocondrial foi verificado em condrócitos de pacientes portadores de OA, mas não em condrócitos de pacientes normais. O grande número de condrócitos apoptóticos na cartilagem acometida por OA deve-se, em grande parte, à disfunção mitocondrial (PETIT et al., 1997; GREEN; REED, 1998). As EROs causam dano às mitocôndrias, reduzindo a integridade e a capacidade de reparo de seu DNA, levando à morte do condrócito (GRISHKO; WILSON; PEARSALL, 2009). A síntese e a mineralização da

matriz cartilágnea são moduladas pelo equilíbrio entre a geração e o consumo de ATP, fazendo com que o modo através do qual os condrócitos geram energia seja um tópico de interesse. Os condrócitos, especialmente nas camadas mais profundas da cartilagem, são expostos a baixas tensões de oxigênio, enquanto aqueles mais próximos da cavidade articular estão, supostamente, expostos a uma tensão de oxigênio mais alta. Apesar de alguns vasos esparsos penetrarem a cartilagem, a maior parte dos nutrientes advém da membrana sinovial. Assim, muitos condrócitos recebem nutrientes apenas por difusão do líquido sinovial ou do fluido tissular e ajustam seu metabolismo oxidativo, ou taxa de respiração, a esta baixa disponibilidade de oxigênio. É importante enfatizar que as zonas superficial e intermediária da cartilagem são relativamente anóxicas, mas que nelas, ainda assim, a fosforilação oxidativa mitocondrial é 18 vezes mais eficiente do que a glicólise na geração de energia. Evidências de que os condrócitos podem utilizar o metabolismo oxidativo para produção de energia química advém da observação de que eles contêm desidrogenases mitocondriais, de que mitocôndrias de condrócitos isoladas podem utilizar substratos do ciclo do ácido tricarboxílico e de que as mitocôndrias dos condrócitos contêm enzimas necessárias para a fosforilação oxidativa e transporte de elétrons (BLANCO; LÓPEZ-ARMADA; MANEIRO, 2004). No entanto, por serem os condrócitos da cartilagem articular altamente glicolíticos (80% da glicose é metabolizada a lactato pela via anaeróbica), a instalação da OA mediada pela geração de EROs na mitocôndria não foi inicialmente elencada dentre os modelos para explicar a patogenia da OA.

A disfunção mitocondrial pode afetar a integridade dos condrócitos e da matriz de várias formas. A insuficiente produção de ATP mitocondrial pode ser considerada como um dos fatores que contribuem para a falência metabólica da cartilagem na OA, por causar inibição da síntese de colágeno e proteoglicanas de matriz (JOHNSON et al., 2000). A análise da cadeia transportadora de elétrons mitocondriais nos condrócitos da cartilagem afetada por OA mostrou significativa redução nos complexos enzimáticos da cadeia, com diminuição da eficiência do metabolismo oxidativo. Como compensação, nestas circunstâncias, a massa mitocondrial está aumentada numa tentativa de suprir a deficiência na cadeia transportadora. (BLANCO; LÓPEZ-ARMADA; MANEIRO, 2004)

A mitocôndria ainda participa do desencadeamento de efeitos citotóxicos e inflamatórios que contribuem para a instalação da OA. Ela parece ser um efector da atividade citotóxica do TNF- α , mediado por degeneração da ultraestrutura mitocondrial, pela diminuição do transporte de elétrons e pela geração de EROS (TERKELTAUB et al., 2002).

As alterações celulares induzidas pelo estresse oxidativo também são documentadas na degeneração senil da mitocôndria; elas são consequentes ao vazamento de elétrons da cadeia transportadora oxidativa, que resulta em significativo dano ao genoma mitocondrial (GARNHEIM; CORTOPASSI, 1992; OLDEN, MELOV, 2001). O genoma mitocondrial está particularmente exposto ao estresse oxidativo pela proximidade com a cadeia oxidativa, e por não possuir a proteção de uma membrana nuclear. Ainda, a baixa capacidade reparativa do DNA mitocondrial, comparada à das outras células, potencializa o dano oxidativo (KARAHALIL et al., 2002). O colapso do potencial de membrana da mitocôndria é associado ao inchamento da organela, rompimento da membrana mitocondrial externa e liberação de fatores pró-apoptóticos, como citocromo c, o fator indutor de apoptose e pró- caspases, enzimas fundamentais para a conclusão do processo de apoptose (BLANCO; LÓPEZ-ARMADA; MANEIRO, 2004).

As mitocôndrias dos condrócitos também são importantes para o processo de mineralização da MEC, por serem especializadas no transporte de cálcio. A iniciação do processo de mineralização do tecido está ligada a uma alteração do estado redox das células, uma vez que os nucleotídeos reduzidos de piridina encontram-se dramaticamente aumentados nos condrócitos da zona hipertrófica. A formação de complexos de minerais foi demonstrada em estruturas denominadas vesículas da matriz e nas mitocôndrias. A liberação do cálcio mitocondrial ocorre de maneira concomitante ao carregamento destas vesículas com o íon, no início do processo de mineralização, na cartilagem de crescimento. A supressão da respiração mitocondrial promove a mineralização dos condrócitos, mediada pelas vesículas de matriz (JOHNSON et al., 2000; TERKELTAUB et al., 2002).

2.4.4 As EROS e a degeneração da matriz extracelular da cartilagem

As enfermidades inflamatórias, tais como a OA, são acompanhadas por infiltrados de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos. Estimuladas, estas células são capazes de liberar EROS, que reagem em diferentes intensidades com os componentes da MEC. De maneira similar, condrócitos e sinoviócitos estimulados são capazes de produzir EROS em grandes quantidades, contribuindo para a ocorrência do estresse oxidativo. O dano oxidativo tem repercussão extremamente importante na matriz cartilaginosa, uma vez que ela dispõe de

poucos sistemas de proteção antioxidante, quando comparada as células nela contidas. (FUCHS B; SCHILLER, 2013).

Sabidamente, as EROs afetam a MEC tanto por inibir ativamente sua formação como por induzir sua degradação. Elas diminuem a síntese de proteoglicanos e colágeno através da supressão da oxidação fosforilativa na mitocôndria e da formação de adenosina trifosfato (JOHNSON et al., 2000), comprometendo fatalmente o suprimento energético da célula. As EROs atuam também mediando o efeito de citocinas inflamatórias que inibem a síntese de componentes da matriz e diminuindo a sensibilidade dos condrócitos aos fatores de crescimento, prejudicando os processos de reparação da cartilagem (HENROTIN; BRUCKNER; PUJOL et al., 2003).

Vários estudos demonstram que os radicais livres inibem a síntese de proteoglicanos pela cartilagem articular (BATES; LOWTHER; HANDLEY, 1984; ASADA et al., 1999) e que as EROS são capazes de degradar proteoglicanos e fibras de colágeno, mesmo na cartilagem íntegra (BURKHARDT et al., 1986). Algumas citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β , estão envolvidas nas perturbações do metabolismo da cartilagem articular mediadas pelas EROs, tais como os efeitos da IL-1 mediados pelo NF- κ B na regulação genes envolvidos na degradação da MEC (HENROTIN; KURZ; AIGNER, 2005) e alterações na produção de MMPs e collagenases, que tem papel importante na destruição irreversível da MEC (MIX; BRINCKERHOFF, 2002; LIM; KIM, 2011; MENGSHOL; AHMAD et al., 2011). As EROs atuam como segundo-mensageiros obrigatórios na sinalização do condrócito, levando ao aumento da produção da MMP-13, particularmente (DEL CARLO et al., 2007). As EROs também prejudicam o metabolismo da MEC, desregulando a produção do radical superóxido e da NADPH oxidase (CHENEVIER-GOBEAUX et al., 2006), contribuindo através destes mecanismos para adicional inibição da síntese e aumento da degradação de proteoglicanos e colágeno (GREENWALD; MOY, 1979).

Condrócitos de coelhos expostos ao lipopolissacáride apresentaram aumento na degradação de agregam, que foi revertida pelo tratamento destes condrócitos com antioxidantes, demonstrando a existência de um mecanismo oxidativo, dependente do condrócito, como responsável pela degradação do agregam na OA (TIKU; GUPTA; DESHMUKH, 1999).

Os primeiros relatos da ação deletéria dos radicais livres sobre o colágeno demonstraram que a exposição ao oxigênio singlete reduziu sua viscosidade, impediu a

formação de fibrilas e alterou sua composição primária de aminoácidos (VENKATASUBRAMANIAN; JOSEPH, 1977). Greenwald e Moy (1979) demonstraram que o colágeno exposto ao radical superóxido não formava um gel. As EROs parecem, ainda, serem capazes de se somar a outros sistemas degradadores de colágeno, rompendo sua estrutura quaternária, ou promovendo fissuras iniciais em suas moléculas, que levarão a posterior susceptibilidade enzimática (CUZZOCREA, 2006). As EROs também estão implicadas na diminuição do metabolismo do colágeno (ALTINDAG et al., 2007) e em sua degradação através da peroxidação lipídica (TIKU et al., 2003).

O estresse oxidativo contribui para a degradação da MEC também inibindo a síntese de proteoglicanas induzida pelo IGF-1, através da regulação diferencial das vias de sinalização fosfatidilinositol quinase-Akt e MAPK (YIN; PARK; LOESER, 2009) e pelo aumento da resistência dos condrócitos à estimulação anabólica por este fator de crescimento (LOESER et al., 2002). Atua ainda, contribuindo para a falência dos processos de reparação, uma vez que reduz a capacidade das células condrogênicas precursoras de migrar e proliferar, nos locais onde ocorre (FRENKEL et al., 1996).

2.4.5 As EROs e a degradação do Ácido Hialurônico (AH)

O hialuronam é um glicosaminoglicano aniônico, não sulfatado, sintetizado pelas células sinoviais. Ele é responsável pela viscosidade do líquido sinovial, pela nutrição e redução da fricção entre as superfícies articulares (BALAZS, 1974; LAURENT; LAURENT; FRASER, 1996; KNUDSON; KNUDSON, 2001).

A primeira descrição de que as EROs eram capazes de degradar o AH foi feita há mais de 30 anos atrás. A observação de que os estados inflamatórios diminuem a viscosidade do líquido sinovial é corriqueira entre os reumatologistas, e pode refletir mera diluição, degradação ou síntese alterada, como no caso da síntese de ácido hialurônico de baixo peso molecular. A degradação do AH pode ocorrer pela ação das hialuronidases ou pela interação química da macromolécula com espécies altamente reativas, como as EROs (CUZZOCREA, 2006).

A degradação do AH pelas EROs foi produzida por exposição da molécula à radiação gama e pela ação das EROs produzidas por neutrófilos (MYINT et al., 1987), pelas ações da xantina oxidase ou hipoxantina ou xantina (MCCORD, 1974), pela ação do íon ferroso, com ou sem adição de ascorbato, pelo H_2O_2 , tióis ou penicilamina (MCCORD, 1985; BLAKE et al., 1989); pela ação do oxigênio singlete produzido pela exposição de um corante sensível à luz, por radicais livres presentes na fumaça do cigarro (MCDEVITT et al., 1989), e pelo sistema da mieloperoxidase (BAKER et al., 1989b).

O estresse oxidativo mostrou ser capaz de provocar a despolimerização dos glicosaminoglicanos e do AH em particular, (BLAKE et al., 1981; MOSELEY et al., 1995; SÖLTES et al., 2006), reduzindo a capacidade de lubrificação das superfícies articulares. A diminuição da viscosidade do líquido sinovial que decorre da injúria oxidativa (GREENWALD; MOY, 1980) apresenta-se como um sensível indicador do dano oxidativo precoce ao ácido hialurônico (MCNEIL et al., 1985).

A despolimerização do ácido hialurônico no líquido sinovial ocorre principalmente pela ação do radical hidroxila, proveniente da decomposição do H_2O_2 e catalisada pelo ferro, livre ou ligado ao AH. A degradação do ácido hialurônico induzida pela xantina oxidase é inibida fortemente pela SOD e pela catalase, enquanto a degradação pela auto-oxidação de íons ferrosos é fracamente inibida ou não responsiva a esta ação enzimática (BETTS; CLELAND, 1982; SAARI, 1991; SAARI et al., 1993).

A sobrecarga mecânica imposta experimentalmente, sob a forma de ciclos de estiramento tênsil, também é capaz de induzir à despolimerização do AH e induzir a geração de EROs em condrócitos de bovinos. Esta observação evidencia o importante papel das espécies reativas na despolarização do AH induzida por estresse mecânico (YAMAZAKI et al., 2003).

Antioxidantes, como a N-acetilcisteína, inibem a expressão de citocinas induzidas pela ativação do NF- κ B, estimulado por fragmentos de AH, em macrófagos e células epiteliais. Este fato demonstra o papel central das EROs no ciclo que se estabelece entre a injúria tecidual, como fonte geradora de espécies reativas, que são por sua vez responsáveis pela degradação do AH, e o papel dos fragmentos desta molécula na ativação de macrófagos do sistema imune inato, via TLRs, como fomentadoras de adicional produção de EROs. A ativação do sistema imune incrementa a produção de EROs pelos macrófagos ativados,

ativando novamente NF- κ B e estimulando a produção de citocinas inflamatórias, com perpetuação do processo de fragmentação do AH (EBERLEIN et al., 2008)

2.4.6 As EROs e o processo de ossificação endocondral.

A geração de EROs pelas NADPH oxidases são importantes para a transdução de sinais em células não fagocíticas, mas pouco se sabe sobre seu papel na condrogênese. O processo de ossificação endocondral, que inclui a maturação, proliferação e hipertrofia dos condrócitos e a mineralização da MEC, é responsável pela maior parte do crescimento longitudinal do osso, tanto durante o desenvolvimento embrionário, como no período pós-natal. Este processo está sujeito a mecanismos precisos de controle, que equilibram a proliferação dos condrócitos com sua diferenciação terminal. Distúrbios nestes mecanismos de controle resultam em encurtamento dos ossos (ADAMS; COHEN; LASSOVÁ, 2007) ou falhas no processo de ossificação endocondral, como ocorre nas osteocondroses.

Alguns tipos de NADPH oxidases, como a Nox 2 e a Nox 4, tem alta expressão em condrócitos, durante os processos de diferenciação e hipertrofia. O bloqueio destas Nox, e sua consequente depleção, suprime a geração de EROs e a diferenciação de linhas de células condrogênicas. Adicionalmente, quando privadas destas Nox as células sofrem apoptose. Nelas, a inibição da fosforilação do Akt com subsequente ativação da via ERK é observada, juntamente com a inibição do acúmulo de proteoglicanos nos condrócitos primários. Estes achados demonstram como a geração de EROs pela Nox 2 e pela Nox 4 é fundamental para a sobrevivência e diferenciação dos condrócitos, nos estágios iniciais da condrogênese (KIM et al., 2010), reforçando a função reguladora destas moléculas.

Durante a ossificação endocondral, o papel fundamental das EROs é o de atuar como mensageiro biológico, induzindo os condrócitos a cessarem a proliferação e se diferenciarem em condrócitos hipertróficos, através de um processo finamente coordenado, e então entrarem em apoptose (MORITA et al., 2007). Desta forma, a morte celular programada é uma etapa essencial na formação do osso, e na cartilagem de crescimento é parte do processo de desenvolvimento e remodelamento da MEC (KÜHN et al., 2004).

A inibição da proliferação dos condrócitos e da indução do fenótipo hipertrófico são induzidas pela produção excessiva de EROS, e este excesso pode ser verificado em

condrócitos hipertróficos. Altas concentrações de EROs nos condrócitos induzem diferenciação hipertrófica prematura, defeitos proliferativos e apoptose (MORITA et al., 2007). Além da apoptose, a hipertrofia dos condrócitos está associada a angiogênese e mineralização da MEC, corroborando para a constatação de que a regulação dos níveis de EROs é fundamental para o crescimento longitudinal dos ossos. Antioxidantes como a N-acetilcisteína são capazes de inibir estes processos (HIRAO et al., 2006; MORITA et al., 2007).

Ainda em relação às perturbações nos processos de diferenciação celular, os fibroblastos sinoviais, assim como as células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, apresentam potencial de diferenciação reduzido em pacientes portadores de OA. Tratamentos com citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , levam à expressão de moléculas de superfície, à secreção de moléculas que potencializam a inflamação e à produção de EROs que inibem o processo de diferenciação celular, reduzindo o potencial reparador do organismo frente a uma injúria articular (YELLIN et al., 1995).

2.4.7 As EROs e o remodelamento ósseo

Conforme descrito, a participação da ossatura subcondral na instalação e desenvolvimento da OA é fundamental. Em relação às EROs, evidências têm se acumulado em relação a seu papel e ao efeito dos desequilíbrios redox na biologia óssea. O osso é um órgão dinâmico, com ciclos de reposição e remodelamento bem regulados, para permitir o desempenho de funções vitais, como crescimento, locomoção, proteção e homeostase do cálcio e fósforo (WAUQUIER et al., 2009). Estudos recentes examinaram a associação das EROs e dos processos regulatórios nas afecções ósseas, contribuindo para definir uma base molecular para suas atividades.

A produção de EROs está particularmente envolvida na homeostase do tecido mineral e contribui para o remodelamento ósseo principalmente através de sua participação nos processos de reabsorção óssea (HA et al., 2004; ABDOLLALI et al., 2005; LEE et al., 2007; WAUQUIER et al., 2009). Numerosos estudos evidenciaram a correlação entre aumento do estresse oxidativo e a osteoporose (ALTINDAG et al., 2007; SENDUR et al., 2009) e em

ratos, a indução do estresse oxidativo com um agente inibidor da síntese de glutathione, causou osteonecrose tibial (ICHISEKI et al., 2006).

Por outro lado, conforme vimos, as EROs estão envolvidas no processo de hipertrofia dos condrócitos e tomadas em conjunto, estas informações demonstram que as EROs não só diretamente promovem a osteoclastogênese, mas também contribuem para a perda de massa óssea através da indução da apoptose e da diminuição da diferenciação e da atividade dos osteoblastos. Afetando os dois tipos celulares, condrócitos e osteoblastos, bem como a comunicação entre as células ósseas, o estresse oxidativo revela-se como fator da maior importância para o perfeito funcionamento da unidade osteocondral (WAUQUIER et al., 2009).

2.4.8 O estresse oxidativo e o Líquido Sinovial

Alterações nos constituintes do líquido sinovial podem refletir eventos fisiológicos da cartilagem articular e de outros componentes articulares, bem como eventos relacionados a enfermidades osteocondrais. Particularmente em relação à avaliação do estresse oxidativo através de biomarcadores no líquido sinovial, os resultados são conflitantes e ainda escassos.

A redução da SOD tem sido documentada como um dos achados mais precoces no líquido sinovial de articulações de portadores de OA, associada à presença de citocinas inflamatórias, como o TNF- α . (AFONSO et al., 2007; GÜVEN et al., 2007; SCOTT et al., 2010). A atividade da SOD é um componente chave na proteção das células e da MEC cartilagínea contra os efeitos do radical superóxido e de seus derivados. (AFONSO et al., 2007). A SOD extracelular é o principal captador de radicais livres nos espaços e fluidos extracelulares e Regan et al. (2008) demonstraram concentrações diminuídas desta enzima nos estágios mais avançados da OA, quando comparadas às de articulações que havia sofrido trauma agudo, mas onde não havia ocorrido dano cartilagíneo. Enquanto a articulação que sofreu injúria recente pode ser capaz de aumentar ou manter a secreção de SOD, parece que a articulação nos estágios mais avançados da OA não é capaz de fazê-lo, a despeito do aumento do estresse oxidativo verificado nesta situação. Agravando o problema, o declínio na produção de glutathione e ascorbato, associados à depleção de sistemas antioxidantes e à idade, podem ser fatores potencializadores da ocorrência de baixas concentrações de SOD. A

somatória dos efeitos das alterações observadas nestes sistemas antioxidantes do líquido sinovial acelera os efeitos deletérios das EROs sobre a estabilidade da MEC. (REGAN et al., 2008).

A análise do líquido sinovial de articulações acometidas por OA, na espécie humana, não mostrou diferenças em relação às concentrações de TBARs, ferro e GSH, quando comparada a de articulações que haviam sofrido trauma articular. Também não houve diferença entre as atividades das enzimas GPx e SOD, e apenas a concentração de vitamina E foi menor nas articulações afetadas pela OA, indicando que esta vitamina possa ser útil no tratamento destes pacientes (SUTIPORNPALANGKUL et al., 2009).

Já em pacientes diagnosticados com OAPT de joelho, quase todos os sistemas antioxidantes enzimáticos dosados (ZnCuSOD, MnSOD, GPx, glutathione redutase e glutathione S-transferase) apresentaram-se ativados, com exceção da CAT. As concentrações de MDA não se mostraram diferentes no líquido sinovial das articulações afetadas pela OAPT e naquelas acometidas por outras enfermidades. A viscosidade do líquido sinovial mostrou-se marcadamente reduzida no grupo que apresentou hemartrose (OSTALOWSKA et al., 2006; OSTALOWSKA et al., 2007).

O líquido sinovial de articulações metacarpo-falangeanas de equinos acometidos por OA não mostrou evidência de dano oxidativo à proteínas e lipídeos, com concentrações inalteradas de proteína carbonil e MDA, respectivamente, quando comparadas às dos controles. A concentração de grupos proteína carbonil apresentou-se discretamente aumentada, mas não significativamente. As articulações de equinos acometidos por OA apresentaram potencial antioxidante total de ligação radical (TRAP) aumentado, provavelmente relacionado à participação de outros componentes diferentes das proteínas, grupos sulfidril ou ácido úrico nos tecidos articulares em degeneração. (VILLASANTE et al., 2010). Dimock, Siciliano e McIlwraith (2002) encontraram concentrações elevadas de proteína carbonil no líquido sinovial de articulações acometidas por OA e OC, com concentrações maiores de EROs nos equinos jovens acometidos por OC, em comparação com equinos sãos. Daix et al. (2007) também encontraram concentrações elevadas de proteína carbonil e de 8-isoprastano no líquido sinovial de articulações equinas acometidas por OA.

Por outro lado, Murray et al. (2009) não encontraram evidências de estresse oxidativo no líquido sinovial de articulações equinas acometidas por OA, nem em equinos mais idosos, e também não evidenciaram comprometimento da capacidade antioxidante total no líquido

sinovial, quando analisaram as concentrações de ácido ascórbico, dehidroascorbato, ácido úrico, glutathiona, α - tocoferol e TBARs.

2.4.9 Sistemas de defesa antioxidante da cartilagem

O aumento da vulnerabilidade a concentrações elevadas de EROs está relacionado à perda substancial de condrócitos, dados os efeitos citotóxicos destas espécies reativas sobre as células da cartilagem (JALLALI et al., 2005). Para prevenir estes efeitos, os condrócitos possuem um sistema de defesa antioxidante enzimática bem coordenado, formado pela SOD, CAT e GPx (HENROTIN; KURZ; AIGNER, 2005). No entanto, as interleucinas, particularmente a IL-1 β e a IL-6, provocam desregulação do sistema de defesa enzimático antioxidante nos condrócitos. Estas alterações podem levar a um acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células, e consequente ao dano aos condrócitos e suas organelas, frequentemente observados na OA (MATHY-HARTERT et al., 2008).

Condrócitos de suínos expostos ao peróxido de hidrogênio ou a neutrófilos ativados apresentaram atividade aumentada de SOD (BORSICZKY et al., 2003). O aumento da atividade da SOD também foi registrado em *in vitro*, em condrócitos de bovinos, em modelo de indução de estresse mecânico por estiramento tênsil cíclico (YAMAZAKI et al., 2003).

Na cartilagem humana afetada pela OA os níveis de SOD extracelular mostraram ser quatro vezes menores do que os observados em cartilagem de indivíduos que haviam sofrido fratura de bacia, demonstrando que as concentrações de SOD estão diminuídas na cartilagem de pacientes afetados pela OA e que a depleção dos sistemas antioxidantes está associada à sua progressão (REGAN et al., 2005). Este achado foi confirmado em modelo animal, onde a redução da SOD estava associada aos estágios iniciais da OA e ao aumento das concentrações de EROs (SCOTT et al., 2010). Já os níveis de SOD intracelular (MnSOD) encontraram-se aumentados pela ação de citocinas, em culturas de condrócitos humanos, proveniente de cartilagem acometida por OA (MAZZETTI et al., 2001)

Condrócitos de cães expostos ao peróxido de hidrogênio apresentaram diminuição da atividade da SOD e da concentração de GSH. O tratamento dos condrócitos com o antioxidante N-acetilcisteína aumentou a atividade da SOD a níveis comparáveis aos dos condrócitos não expostos ao peróxido de hidrogênio, e induziu a um aumento significativo da

concentração da GSH. Estes resultados sugerem que o uso de antioxidantes pode ser útil no tratamento da OA na espécie canina (DYCUS et al., 2013).

Condrócitos de coelhos tratados com lipopolissacáride apresentaram aumento de degradação do agrecam, fenômeno revertido pelo tratamento destas células com catalase, com captadores de radicais hidroxila, vitaminas antioxidantes, agentes queladores de ferro e com agentes antioxidantes lipofílicos (TIKU; GUPTA; DESHMUKH, 1999).

A pré-incubação de explantes de cartilagem humana com vitamina E, N-acetilcisteína e um mimetizante da SOD foram capazes de bloquear 80% da morte celular induzida por compressão mecânica. Estas observações não só corroboram para a hipótese de que os efeitos deletérios das sobrecargas mecânicas sobre a cartilagem são mediados pelas EROs, como também sugerem que tratamentos para prevenir a OA podem incluir métodos de minimizar o dano oxidativo aos condrócitos (BEECHER et al., 2007).

Experimentos demonstraram que a deficiência de SOD incrementa a severidade dos processos de degradação associados à OA e aumenta a produção de citocinas pro-inflamatórias (ROSS et al., 2004) e que a suplementação de SOD, independente da forma de administração, diminui a severidade da OA experimental (IYAMA et al., 2001; DAI et al., 2003). Auer, Ng e Seawright (1990), estudaram a ação da CAT e da paloseína, um análogo da SOD, sobre a prevenção da degradação do líquido articular de equinos induzida pelas EROs. A paloseína mostrou-se como um efetivo inibidor de radicais livres superóxido, mas não de radicais hidroxila, e a catalase foi moderadamente efetiva como inibidor da redução da viscosidade do líquido sinovial ocasionada pelas EROs, independentemente de sua natureza.

Estudos mostram, ainda, que o treinamento físico tem efeitos benéficos para a preservação da cartilagem articular de ratos afetada por OA, fomentando os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo (CIFUENTES et al., 2010).

2.5 O LÍQUIDO SINOVIAL

Há muito tempo, o líquido sinovial (LS) tem sido estudado, em relação a sua composição e as suas propriedades, em várias espécies (ROPES; BENNETT; BAUER, 1939; ROPES; ROSSMEISL; BAUER, 1940). Nas articulações diartrodiais, ele possibilita a livre

movimentação (IWANAGA et al., 2000) e confere lubrificação às superfícies articulares. A lubrificação é fundamental para o deslizamento da membrana sinovial sobre si própria e sobre outros tecidos e para o deslizamento das superfícies cartilagueas que se apõem (RADIN, PAUL, 1972). A viscosidade do LS é atribuída ao ácido hialurônico (AH), sintetizado pelo Complexo de Golgi dos sinoviócitos do tipo B da membrana sinovial (PREHM, 1984, OGSTON; STANIER, 1953), à proteoglicanos (SWANN et al., 1985) e à fosfolípidos (SCHWARZ; HILLS, 1998) presentes em sua constituição.

O LS é descrito como um dialisado do plasma, para o qual várias macromoléculas são secretadas. O processo de filtração ocorre através da membrana sinovial, facilitado pela fenestração existente entre as células de sua camada íntima. A matriz extracelular nestas áreas contém colágeno, hialuronam, proteoglicanos e fibronectina, constituindo-se numa interface permeável, através da qual a troca de moléculas com tamanho inferior a 10 kDa ocorre, sem deixar de oferecer suficiente resistência para evitar o escape de moléculas maiores presentes no LS. Como resultado, glicose e eletrólitos ocorrem em concentrações similares àsquelas do plasma, mas proteínas encontram-se presentes em concentrações limitadas (STEEL, 2008). A concentração de proteína total no líquido sinovial é de aproximadamente 25% a 35% da concentração de proteína plasmática do mesmo animal (MCILWRAITH, 2005). O LS deve conter nenhum ou poucos eritrócitos e baixos números de células nucleadas totais (menos que $1 \times 10^6/\text{ml}$), das quais a maioria é de células mononucleares (PERSSON, 1971; VAN PELT, 1974).

Alterações na difusão de moléculas pela membrana sinovial ou no metabolismo dos sinoviócitos podem ocorrer em resposta a uma variedade de insultos ou afecções articulares, e serão refletidas por mudanças na composição do LS. Assim, a manutenção da composição do LS dentro de parâmetros normais está intimamente relacionada ao funcionamento adequado da membrana sinovial, mas também ao dos outros componentes articulares. Algumas generalizações podem ser feitas e a análise do líquido sinovial, desta forma, é capaz de fornecer valiosas informações, em conjunto com outras modalidades diagnósticas, sobre a natureza e o curso destas afecções (TEW; HOTCHKISS, 1981; STEEL, 2008). Veremos a seguir, como estes parâmetros podem ser indicativos de eventos relacionados à afecções articulares.

A redução na viscosidade do líquido sinovial pode ocorrer por dois motivos distintos: a presença de efusão e a inflamação da membrana sinovial ou sinovite. O primeiro resulta na diluição do LS pelo influxo de plasma para dentro da cavidade articular, geralmente após um

traumatismo agudo. No caso da sinovite inflamatória, uma adicional redução pode ocorrer através da diminuição da síntese, da quebra enzimática ou pela incompleta polimerização do AH. Quando as duas condições ocorrem simultaneamente, a viscosidade do líquido sinovial assemelha-se à da água. Esta redução na viscosidade reflete a diminuição da concentração de AH (TEW; HOTCHKISS, 1981). A relação entre viscosidade e concentração de AH no líquido sinovial foi demonstrada por Persson (1971) e Saari e Konttinen (1989). Se a presença de efusão e sinovite diminuem a concentração de AH e, assim, a viscosidade do líquido sinovial, por outro lado, observa-se um aumento expressivo da viscosidade com concentrações de AH que excedam 2 a 2,5mg/dl.

O teste do precipitado de mucina dá uma idéia grosseira do conteúdo de AH e de seu grau de polimerização no LS (STEEL, 2008) e deve ser usado em conjunto com outros testes, mais específicos para este fim.

A concentração de proteína total no líquido sinovial aumenta em qualquer circunstância onde haja comprometimento da função seletiva da membrana sinovial, acompanhada por influxo de fluidos e proteínas para a cavidade articular (FOURNIER et al., 1969). A passagem de proteínas plasmáticas do sangue para o líquido sinovial está quantitativamente relacionada ao peso molecular das proteínas e ao grau de inflamação da membrana sinovial. Quanto maior o grau de inflamação, maior o peso molecular e maior a quantidade de proteínas capazes de atravessar a barreira da membrana (KUSHNER; SOMERVILLE, 1971).

A contagem total de células no LS sofre pequenas elevações na maioria das enfermidades articulares mais comuns, refletindo a magnitude da resposta inflamatória que elas desencadeiam. Contagens expressivamente aumentadas são altamente sugestivas de processos de etiologia séptica (TEW; HOTCHKISS, 1981).

A prostaglandina E_2 é um mediador inflamatório rapidamente liberado pelas células da membrana sinovial e da cartilagem em resposta a uma injúria articular, e tem sido usada em equinos como um biomarcador da resposta inflamatória (MURAKAMI et al., 1998). Biomarcadores são medidas bioquímicas, indicativas de um processo biológico ou de resposta à uma intervenção (STEEL, 2008). O princípio que fundamenta o uso de biomarcadores é o de que a sinovite e a degradação da cartilagem envolvem liberação de mediadores inflamatórios e de produtos de degradação da MEC (colágeno tipo II e fragmentos de proteoglicanos) em concentrações aumentadas e detectáveis para o LS e, eventualmente, para

o soro (MCILWRAITH, 2005). Concentrações aumentadas de PGE_2 foram encontradas em articulações de equinos acometidas por processos inflamatórios (MAY et al., 1994; TUNG et al., 2002; HEINECKE et al., 2009) e por OA (CHAN et al., 2005; VAN DEN BOOM et al., 2005; FRISBIE et al., 2008), onde comprometem a MEC cartilagínea por reduzir o conteúdo de proteoglicanos (LIPIELLO et al., 1978), além de incitar resposta dolorosa, estimulando nociceptores terminais periféricos (TCHETINA et al., 2007). Em articulações acometidas por OCD, May et al. (1994) reportaram concentrações de PGE_2 diminuídas.

A análise convencional do LS, apesar de útil, não fornece indicações sobre o grau de comprometimento da cartilagem articular (MCILWRAITH, 2001). A utilização de biomarcadores que permitem apreciar o grau de remodelamento da MEC é de extrema valia na caracterização dos processos metabólicos da matriz, no curso das enfermidades articulares.

O condroitim sulfato (CS) é o mais importante GAG constituinte do agregam e provou ser um biomarcador útil da síntese e da degradação de agregam. Os níveis de CS no líquido sinovial de pacientes humanos encontram-se aumentados após injúria, bem como em casos de OA primária, quando comparados àqueles encontrados no líquido sinovial de pacientes normais (POOLE et al., 1994; MURAKAMI et al., 1998; SAITO et al., 2002).

Apesar da utilização de métodos distintos e variados, o aumento nas concentrações de CS no líquido sinovial já foi bem caracterizado em equinos acometidos por artropatias de variados graus, agudas e crônicas, e também naquelas onde a presença de sinovite ou lesões radiograficamente detectáveis ainda não havia ocorrido, mas onde lesões da cartilagem eram visíveis ao exame artroscópico (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995). Frisbie et al. (1999) encontraram altas concentrações de CS no líquido sinovial do carpo de equinos onde havia fragmentação osteocondral, caracterizando o CS como um ótimo marcador para detecção de alterações osteocondrais. Estes autores, contudo, utilizaram o método que afere as concentrações do epítipo 846, que não detecta o CS, especificamente. Ele demonstra a degradação do agregam através do anticorpo monoclonal 846, que reconhece epítipos relacionados à proteínas na estrutura do agregam, e não à GAG em questão (GLANT et al., 1986). Alwan et al. (1991b) encontraram altas concentrações de CS no líquido sinovial de equinos com OC e OA, em comparação com as concentrações de GAGs do líquido sinovial de articulações normais, empregando o método do azul de dimetilmetileno (DMMB). Este método detecta todos os GAGs presentes no LS e revelou-se inadequado por não permitir a identificação particular do CS, dada a interferência do AH (DE LIMA; BACCARIN; MICHELACCI, 2007). Em relação à OC, especialmente em sua forma dissecante (OCD),

equinos sintomáticos e assintomáticos portadores da condição demonstraram apresentar concentrações elevadas de CS no líquido sinovial quando comparados a equinos sadios (MACHADO et al., 2012). Em equinos de 18 a 52 semanas de idade, acometidos por OCD tarsocrural, no entanto, as concentrações de CS no líquido sinovial, analisadas através das concentrações de epítipo 846, apresentaram-se diminuídas em comparação com aquela de equinos sadios da mesma idade (DE GRAUW et al., 2011b). Em outro estudo achados similares foram reportados em equinos jovens, de 9 a 18 meses de idade (LAVERTY et al., 2000). Baccarin et al. (2014) encontraram concentrações de CS aumentadas, e de forma crescente, em articulações de cavalos de polo, no decorrer da temporada de competição (320 dias). O acompanhamento destes animais a longo prazo revelou uma correlação entre concentrações elevadas de CS no líquido sinovial e predisposição para desenvolvimento da OA nos 24 meses seguintes.

Em relação ao AH, ele é considerado um biomarcador direto e indireto de destruição da cartilagem articular, uma vez que é encontrado na MEC, mas esta é uma fonte menos relevante deste GAG, quando comparada à membrana sinovial (WOESSNER, 1991). Se houver inflamação da membrana sinovial, haverá aumento da secreção de AH para o interior desta estrutura e tecidos adjacentes, mais do que para o espaço articular (ENGSTROM-LAURENT; HALLGREN, 1987). Concentrações diminuídas de AH foram demonstradas em articulações com OA, e naquelas com alterações degenerativas avançadas, em comparação com articulações normais (HILBERT, ROWLEY; ANTONAS, 1984; TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1994; BELCHER et al., 1997). Contudo, as concentrações de AH no LS de articulações com artrite traumática aguda não se mostraram diferentes das de articulações normais (TULAMO et al., 1996).

A análise dos sistemas antioxidantes e de moléculas que evidenciem a ocorrência de estresse oxidativo no LS têm sido empregadas para o estudo do envolvimento das espécies reativas do oxigênio na patogenia das enfermidades articulares. AUER; NG; SEAWRIGHT (1993) reportaram a presença de produtos de oxidação por radicais livres no líquido sinovial de equinos com inflamação articular. Dimock, Siciliano e McIlwraith (2000) encontraram evidências de oxidação proteica no LS de equinos acometidos por enfermidades articulares e Daix et al. (2007) encontraram marcadores de peroxidação lipídica no LS de equinos com OA. A ação das EROs sobre os tecidos articulares resulta em propriedades viscoelásticas comprometidas do LS e degradação de tecido cartilágneo, causando dor e instabilidade mecânica (BERTONE; PALMER; JONES, 2001).

A importância da análise do líquido sinovial para o estudo das artropatias não pode ser suficientemente enfatizada. Em recente revisão sobre o uso de biomarcadores na OA, Lafeber e Spil (2013) consideraram o uso de biomarcadores locais, ou seja aqueles presentes no líquido sinovial, como mais fidedignos no papel de refletir a natureza e a extensão dos eventos ocorridos durante as enfermidades articulares, quando comparados ao uso de biomarcadores sistêmicos, como aqueles identificáveis no soro. A utilização de biomarcadores presentes no líquido sinovial elimina a variabilidade diurna decorrente do metabolismo sistêmico, da ingestão de alimentos, de comorbidades, do remodelamento de outros tecidos conjuntivos, do envolvimento de múltiplas articulações, entre outros fatores.

Outro aspecto importante da análise do LS é a possibilidade de avaliação de novas terapias para o tratamento de enfermidades articulares nos equinos. Esta análise permite examinar os efeitos de medicações comumente empregadas, bem como aqueles de novos tratamentos propostos, sobre a função da membrana sinovial e sobre os processos de degeneração da cartilagem articular (TEW; HOTCHKISS, 1981).

2.6 O PLASMA PROCESSADO AUTÓLOGO (PPA)

Meijer et al. (2003) demonstraram que o processamento do sangue humano resultava num hemoderivado com propriedades terapêuticas. O produto, resultante da centrifugação do sangue, após incubação por 24 horas, a 37°C e 5 % de CO₂ no interior de uma seringa contendo esferas de vidro tratadas com sulfato de cromo, consistia em soro enriquecido com a proteína antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), entre outras citocinas anti-inflamatórias. Os autores verificaram que as concentrações de IL-1ra aumentaram 140 vezes, e que as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 tiveram sua síntese ligeiramente aumentada após o processamento. Eles propuseram, então, que o aumento nas concentrações de citocinas anti-inflamatórias devia-se à estimulação físico-química de células mononucleares do sangue pelas esferas tratadas. O hemoderivado obtido foi denominado de soro condicionado autólogo (SCA) e seu emprego terapêutico foi sugerido, sob o nome comercial de IRAP.

Dado o papel primordial da IL-1 na patogenia das enfermidades articulares (MORRIS et al., 1990; ALWAN et al., 1991a; FERNANDES; MARTEL-PELLETIER; PELLETIER, 2002) o emprego do IL-1ra reveste-se de especial significado para o controle da evolução e

dos sintomas a elas associados. Seu emprego visa antagonizar as ações da IL-1 nas células dos tecidos articulares (HENDERSON et al., 1991), atravésdo bloqueio competitivo dos receptores para a IL-1 (AREND et al, 1990).

Desde então, o ACS têm sido empregado em equinos para o tratamento de OA, principalmente. Resultados de estudos experimentais (FRISBIE et al., 2007) e clínicos mostram a eficácia do ACS no tratamento das enfermidades articulares dos equinos (WEINBERGER, 2008). Seu emprego profilático, após a realização de artroscopias, justifica-se por suas propriedades anti-inflamatórias e condroprotetoras, observadas tanto em equinos (TEXTOR, 2011) como na espécie humana (DARABOS et al., 2009; DARABOS et al. 2011).

A determinação do volume de ACS a ser injetado é feita empiricamente, nos equinos. Meijer et al. (2003) estimaram que sendo a concentração média de IL-1ra no ACS de 3 ng/ml e a concentração média de IL-1 no LS de articulações humanas acometidas por OA de 2,5 pg/ml, o volume de 2ml, recomendado para injeção em joelhos de pacientes humanos, proveria 6ng/ml de IL-1ra (FIRESTEIN et al., 1990). Granowitz et al. (1991) propuseram que uma relação de IL-1/IL-1ra de no mínimo 1:10 seria necessária para inibir a atividade da IL-1. No LS de equinos estas determinações não foram realizadas, e os volumes utilizados variam entre os autores. Weinberger (2008) utilizou volumes de ACS que variaram de 2 a 8 ml, dependendo do tamanho das articulações tratadas, enquanto Frisbie et al. (2007) utilizaram 6ml de ACS em estudo experimental utilizando articulações do carpo de equinos. Textor (2011) propôs injeções intra-articulares de 2ml de ACS, semanalmente, num total de 4 aplicações, para articulações metacarpo/metatarso- falangeanas.

Em 2008, um produto similar ao IRAP, denominado de IRAP II, foi desenvolvido por outra companhia, como meio alternativo de produção de SCA. Neste produto, apesar do emprego de uma seringa semelhante à utilizada para a obtenção do SCA com o *kit* IRAP, bem como de protocolo de processamento semelhante, as concentrações de IL-1ra reportadas eram sete vezes maiores e a relação entre as concentrações de IL-1ra e IL-1 β eram quatro vezes maiores.

Hrara et al. (2011) demonstraram que tanto no IRAP como no IRAP II as concentrações de IL-1ra estavam a aumentadas, mas que após 24 horas de incubação, o *kit* IRAP II fornecia maiores concentrações de IL-1ra, em comparação com o IRAP. Ainda neste experimento, incubando o sangue de equinos para a obtenção de plasma (utilizando tubos heparinizados, ao invés das seringas provenientes dos *kits* comerciais) e soro (através da

adição de sangue a tubos sem anticoagulante) conforme preconizado por Meijer et al. (2003), estes autores verificaram expressiva síntese de IL-1ra e IL-10. A síntese de IL-1ra no soro incubado em tubos secos foi equiparável à observada no IRAP-1. Em relação ao plasma, a adição do sangue a tubos contendo heparina causou redução significativa das concentrações de IGF-1, TNF- α e TGF- β , mas aumentou a concentração de IL-1ra em 1,5 vezes. Em resumo, os autores consideraram surpreendente o aumento de citocinas anti-inflamatórias verificados no soro e no plasma, a despeito da não utilização dos kits comerciais IRAP e IRAP II. Eles atribuíram este achado à propriedade estimulante do vidro sobre o sangue total, conforme postulado por Meijer et al. (2003). Anteriormente Kampschmidt, Worthington e Mesecher (1986) haviam reportado o efeito estimulante da sílica sobre macrófagos de coelhos, incrementando a produção de IL-1.

Além da não obrigatoriedade das seringas provenientes dos *kits* para a obtenção do hemoderivado enriquecido em citocinas anti-inflamatórias, o estudo de Hrara et al. (2011) demonstrou a importância do tempo de incubação do sangue para a concentração destas citocinas de interesse, no produto final. Em todos os produtos (IRAP, IRAP II, sangue e plasma) a incubação por 24 horas aumentou em 250 vezes a concentração de IL-10, quando comparada àquela presente nas amostras após 1 hora de incubação.

A IL-10 é reconhecida como a mais importante citocina anti-inflamatória (OPAL; DE PALO, 2000), sendo capaz de modular a resposta leucocitária (ADIB-CONQUI; CAVAILLON, 2009) e a geração de radicais livres em macrófagos (DOKKA et al., 2001) e neutrófilos, inibindo a fosforilação de um dos componentes da NADPH oxidase (DANG et al., 2006). Estas propriedades levam muitos autores a especular sobre sua participação nos efeitos benéficos do SCA, quando empregado para o tratamento das enfermidades articulares.

Em relação à terapia com SCA algumas questões fundamentais permanecem. Uma delas refere-se à diversidade de moléculas presentes em sua composição. O SCA é composto de várias citocinas anti-inflamatórias e potencialmente benéficas para o tratamento das artropatias. Resultados de estudos empregando espectroscopia de massa confirmam a presença de muitas citocinas no SCA e pesquisas futuras devem ser conduzidas nesta área. Também não se sabe, ao certo, qual o verdadeiro papel de cada componente, ou o de sua associação, no desencadeamento dos efeitos desejáveis do SCA (CHEVALIER, 2010). Wehling et al. (2007) lembram que enquanto o IL-1ra pode desempenhar um papel importante na composição deste soro clinicamente ativo, ele não é o único fator presente. Algumas citocinas anti-inflamatórias nele presentes, como a IL-10, também possuem efeito

antioxidante. Este efeito pode representar uma alternativa ou um complemento para a explicar os mecanismos de ação do SCA.

Com base nestas observações, Brossi, Baccarin e Massoco (2012) empregaram plasma processado, como descrito por Hrara et al. (2011), utilizando tubos de vidro heparinizados, para constituir o hemoderivado que empregaram sobre células do líquido sinovial equino. Resumidamente, células obtidas do LS de equinos livres de doenças articulares foram utilizadas para constituir um *pool* celular, que foi estimulado, *in vitro*, para a produção de EROs. A adição do plasma processado inibiu significativamente a geração de radicais livres por estas células, demonstrando seu efeito antioxidante.

O plasma assim processado foi denominado de plasma processado autólogo (PPA); sua composição foi determinada *in vitro*, e seus efeitos a curto e longo prazo, sobre articulações de equinos saudáveis, foram observados *in vivo* (MOREIRA et al., 2014)¹. A aplicação do produto revelou-se segura e o processamento do sangue resultou em aumento das concentrações de IL-1ra, sem incremento concomitante das concentrações de citocinas inflamatórias. A curto prazo, dentro das 48 horas seguintes à aplicação, o PPA desencadeou uma leve e transitória resposta inflamatória. Com um protocolo de aplicação semanal, no entanto, a administração de PPA resultou em menores concentrações de PGE₂ e CS no líquido sinovial, e em contagens inferiores de células nucleadas totais (MOREIRA et al., 2014)¹.

¹ MOREIRA, J. J.; MORAES, A. P. L.; BROSSI, P. M.; MACHADO, T. S. L.; MICHELACCI, Y. M.; MASSOCO, C. O.; BACCARIN, R. Y. A. **Autologous processed plasma**: cytokine profile and effects upon injection in healthy equine joints. (Aceito para publicação em 2014). Pré-print.

3 JUSTIFICATIVA

O uso de hemoderivados para o tratamento de lesões musculoesqueléticas tornou-se frequente na clínica ortopédica equina. Isto se deu em função da alta prevalência de injúrias do aparelho locomotor, fomentada pelo crescente número de participantes em atividades atléticas, na espécie. Apesar do emprego assíduo na clínica ortopédica, a composição dos hemoderivados não foi satisfatoriamente padronizada e dificuldades para obter esta padronização advém de particularidades dos derivados autólogos, relacionadas a características intrínsecas dos doadores. Adicionalmente, os hemoderivados são obtidos por metodologias distintas e exercem seus efeitos através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos.

As propriedades antioxidantes do PPA, demonstradas anteriormente sobre células do líquido sinovial equino estimuladas *in vitro* (BROSSI; BACCARIN; MASSOCO, 2012), despertaram interesse para o potencial efeito do hemoderivado sobre a geração de radicais livres e para sua influência sobre os sistemas antioxidantes no líquido sinovial de equinos acometidos por enfermidades articulares, *in vivo*.

As lacunas existentes na demonstração e na compreensão dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios dos hemoderivados, *in vivo*, somadas à escassez de estudos verificando os múltiplos aspectos do equilíbrio redox no líquido sinovial de equinos portadores de enfermidades articulares motivaram a realização deste trabalho.

4 OBJETIVO

Os principais objetivos deste estudo foram:

1. Identificar alterações no equilíbrio redox e no metabolismo dos tecidos articulares em equinos acometidos por OA ou OCD e submetidos à artroscopia, no período pós-operatório imediato;
2. Comparar a OA e a OCD, quanto a características do equilíbrio redox e aspectos inflamatórios e metabólicos articulares neste período;
3. Avaliar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do PPA no período pós-operatório imediato em articulações acometidas por OA ou OCD tratadas por artroscopia.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Este foi um estudo prospectivo onde animais portadores de OCD ou OA, atendidos e operados no Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário – FMVZ – USP, no período entre junho de 2011 e setembro de 2013, foram comparados em relação ao tratamento com hemoderivado intra-articular ao final do procedimento cirúrgico (grupo tratamento), com animais que não receberam tratamento intra-articular (grupo controle). Para tanto, estes animais foram divididos em 4 grupos distintos:

- Grupo COA - animais diagnosticados com OA, e que ao término do procedimento cirúrgico não receberam tratamento intra-articular, constituindo o grupo controle da OA. Formaram este grupo 5 equinos, machos, e idade entre 2 e 14 anos de idade. Sete articulações tíbio-társicas acometidas por OA foram estudadas (Quadro 1).
- Grupo POA - animais diagnosticados com OA, e que ao término do procedimento cirúrgico receberam tratamento intra-articular com PPA, constituindo o grupo tratamento da OA. Formaram este grupo 6 equinos, machos, com idade variando entre 2 a 10 anos de idade. Nove articulações foram tratadas e observadas, incluindo uma articulação metacarpo-falangeana, três articulações tíbio-társicas, três articulações fêmoro-tíbio-patelares e duas articulações rádio-carpo-metacarpianas (Quadro 1).
- Grupo COC - animais diagnosticados com OCD, e que ao término do procedimento cirúrgico não receberam tratamento intra-articular, constituindo o grupo controle da OCD. Este grupo foi formado por 6 equinos machos, com idade variando entre 2 a 6 anos. Sete articulações tíbio-társicas foram estudadas (Quadro 1).
- Grupo POC - animais diagnosticados com OCD, e que ao término do procedimento cirúrgico receberam tratamento intra-articular com PPA, constituindo o grupo tratamento da OCD. Este grupo foi formado por 6 equinos, onde a maioria apresentava mais de uma articulação acometida por OCD, totalizando 12 articulações tratadas e observadas. Dentre elas observamos oito articulações tíbio-társicas, três articulações metacarpo-falangeanas e uma articulação interfalangeana distal (Quadro 1).

O diagnóstico da enfermidade articular, OA ou OCD, foi determinado durante o exame de claudicação padrão, realizado pelo Serviço de Clínica Médica de Equinos ou pelo

Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário – FMVZ – USP em todos os animais com histórico de claudicação ou encaminhados para o hospital para realização de artroscopia.

Todos os animais tiveram líquido sinovial das articulações afetadas coletado e avaliado em dois momentos, a saber, o momento 0 horas, imediatamente antes do início da artroscopia, e 48 horas após a realização da mesma (momento 48 horas).

Quadro 1 – Animais dos grupos controle e tratamento da OA e da OC – São Paulo - 2010 /2013

(Continua)

ANIMAL	ARTICULAÇÃO	RAÇA	LOCAL	PESO	IDADE	SEXO
COA 1	A1	PSL	TT	363	3	M
COA 2	A2	BH	TT		14	M
COA 2	A3	BH	TT	642	14	M
COA 3	A4	BH	TT	574	3	M
COA 4	A5	BH	TT	528	3	M
COA 5	A6	BH	TT	446	2	M
COA 5	A7	BH	TT		2	M
POA 1	A8	QM	MCF	451	10	M
POA 2	A9	ZANG	TT	622	7	M
POA 3	A10	ZANG	TT	697	8	M
POA 4	A11	PSL	FP	470	6	M
POA 5	A12	QM	RC	465	3	M
POA 5	A13	QM	IC	465	3	M
POA 6	A14	PSL	FP	490	2	M
POA 6	A15	PSL	FP	490	2	M
POA 6	A16	PSL	TT	490	2	M

(Conclusão)

ANIMAL	ARTICULAÇÃO	RAÇA	LOCAL	PESO	IDADE	SEXO
COC 1	A17	PSL	TT	480	2	M
COC 2	A18	PSL	TT	481	5	M
COC 3	A19	PSL	TT	468	6	M
COC 3	A20	PSL	TT	468	6	M
COC 3	A21	PSL	MTF	468	6	M
COC 4	A22	PSL	TT	363	3	M
COC 5	A23	PSL	TT	515	3	M
COC 6	A24	BH	TT	498	2	M
POC 1	A24	HAN	TT	566	3	F
POC 1	A25	HAN	TT	566	3	F
POC 2	A26	QM	MCF	460	4	M
POC 3	A27	PSL	TT	460	3	M
POC 3	A28	PSL	TT	460	3	M
POC 4	A29	PSL	TT	467	3	M
POC 4	A30	PSL	TT	467	3	M
POC 5	A31	PSL	TT	518	3	M
POC 5	A32	PSL	TT	518	3	M
POC 5	A33	PSL	IFD	518	3	M
POC 6	A34	BH	MCF	515	3	F
POC 6	A35	BH	MCF	515	3	F

Legenda: PSL, puro sangue lusitano; BH, brasileiro de hipismo; HAN, hanoveriano; QM, quarto de milha; TT, tíbiotársica; MCF, metacarpo-falangeana; FP, fêmorapatelar; RC, rádio-cárpica; IC, inter-cárpica; MTF, metatarso -falangeana; IFD, interfalangeana distal.

5.2 OBTENÇÃO DO PPA

Para obtenção do PPA, aproximadamente 50 ml de sangue da veia jugular esquerda de cada equino foram retirados assepticamente em tubos com heparina de sódio, 24 horas antes da realização do procedimento cirúrgico. As amostras foram devidamente acondicionadas e incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 horas. No fluxo laminar, utilizando uma pipeta pasteur estéril, o plasma foi transferido para um tubo falcon de 15 ml, também estéril, e centrifugado a 24°C e 300 x g durante 10 minutos (Quadro 2). As amostras foram novamente levadas para o fluxo laminar, e transferidas para outro tubo falcon de 15 ml estéril, evitando aspirar o botão celular no fundo do tubo. O plasma foi centrifugado pela segunda vez a 24°C e 900 x g, durante 10 minutos. Com agulha hipodérmica 40x16 e seringa de 10 ml, o plasma foi aspirado do tubo falcon e esterilizado por meio da filtração em microfiltro millipore 0.22 µm. As amostras foram aliquotadas em tubo falcon estéril para aplicação intra-articular imediata.

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

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

5.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E ARTROSCÓPICO

Após jejum alimentar prévio de 12 horas e hídrico de 6 horas, os animais foram submetidos à anestesia geral, com uso do seguinte protocolo anestésico: medicação pré-anestésica com cloridrato de xilazina 10% ² na dose de 0,6 mg/kg por via intravenosa (IV); indução com associação de diazepam³ na dose de 0,05mg/kg, IV, e quetamina 10%⁴, IV, e

² Sedomin – Konig, Avellaneda, Argentina

³ Compaz – Cristália, Itapira, Brasil

⁴ Dopalen – Vetbrands, Paulínea, Brasil

manutenção com isoflurano⁵ vaporizado em oxigênio a 100%. Imediatamente antes da sedação, foi realizada tricotomia das áreas a serem abordadas cirurgicamente.

No centro cirúrgico, o posicionamento dos animais variou na dependência da articulação a ser abordada cirurgicamente. A antisepsia foi realizada com solução degermante de clorexidina, seguida de solução alcoólica de clorexidina, esta última efetuada pelo próprio cirurgião. Após a montagem do campo operatório, foi realizada artrocentese com agulha 40X10 mm no recesso de eleição para cada articulação, e neste momento foi realizada a colheita de líquido sinovial para a análise do momento 0 horas. Na sequência, a cavidade articular foi distendida com solução de Ringer com lactato, em volume compatível com o porte físico do animal e da capacidade volumétrica da articulação. Com o uso de lâmina de bisturi nº 15, foi realizada a incisão de pele, tecido subcutâneo e cápsula articular para a introdução da cânula artroscópica com obturador rombo. Em seguida, o obturador foi removido e o artroscópio⁶ foi inserido e travado junto à cânula, permitindo a visualização da cavidade articular. Para a criação do portal de acesso ao instrumental, uma agulha 40X10 mm foi adequadamente posicionada. Uma vez determinado o local mais adequado de acesso, foi realizada a incisão da pele, do tecido cutâneo e da cápsula. A articulação permaneceu distendida com solução de Ringer com lactato, em temperatura ambiente, até o término do procedimento. Pontos em X (Sultan) com fio de náilon 2-0 foram utilizados para a sutura da pele. Neste momento, nos Grupos POA e POC o PPA previamente preparado foi injetado na cavidade articular, em volume que variou de 4 a 12 ml, na dependência da dimensão da articulação em questão. Nos grupos controles COA e COC nada foi injetado.

O antibiótico empregado no período pós-operatório foi amicacina⁷ na dose de 15 mg/kg IV, uma vez ao dia, por três dias, e como terapia anti-inflamatória e analgésica foi administrada fenilbutazona⁸, na dose de 2,2 mg/kg, IV. A ferida foi mantida com penso protetor e os curativos foram realizados a cada troca com líquido de Dakin, até a retirada dos pontos de sutura, o que ocorreu por volta do 10º dia pós-operatório.

⁵ Isoforine – Cristália, Itapira, Brasil

⁶ Modelo Hopkins 11, Karl Storz®- Endoscope: H.Strattner &Cia. Ltda – Rio de Janeiro, Brasil

⁷ Sulfato de Amicacina – Nova Farma, Anápolis, Brasil

⁸ Equipalazone - Marcolab, Duque de Caxias, Brasil

5.4 COLETA DE MATERIAL

5.4.1 Líquido Sinovial

As colheitas de líquido sinovial foram realizadas em dois momentos. O momento 0 horas ocorreu sob indução anestésica, antes do início da infusão articular da solução de Ringer com lactato para a realização da artroscopia, conforme descrito. O segundo momento ocorreu 48 horas após a realização do procedimento cirúrgico (momento 48 horas), seguindo o mesmo protocolo de antissepsia e empregando técnica adequada para punção dos recessos articulares. Para tal fim, quando necessário, os animais foram sedados e contidos em tronco, com ou sem ajuda de métodos físicos de contenção.

Em ambos momentos, a maior quantidade possível de líquido articular foi aspirada.

5.5 ANÁLISE DO MATERIAL

Após cada coleta, uma pequena fração da amostra foi destinada à análise física e celular. O restante foi imediatamente centrifugado⁹ a 4°C e 2000 x g, durante 15 minutos. O sobrenadante foi aliquoteado em microtubos de 1,5 ml e congelado a -80°C para futuras análises: avaliação do estado redox, GAGs, PGE₂, proteína total e ureia.

5.5.1 Avaliação do estado redox do líquido sinovial

5.5.1.1 Determinação da atividade da enzima Catalase

A catalase é uma enzima antioxidante presente na maioria das células aeróbicas, estando envolvida na detoxificação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

⁹ Centrífuga 5417 R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha

No presente estudo, a atividade da catalase no LS foi quantificada pelo *kit* Catalase Assay Kit (Ref.: 707002), Cayman Chemical Company (EUA). O método é baseado na reação da catalase da amostra com o metanol, utilizado como doador de hidrogênio, na presença de concentração ótima de H_2O_2 . O formaldeído produzido pela reação é mensurado de forma colorimétrica após sua associação a um cromógeno (4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol – *Purpald*). O *Purpald* forma um composto que reage, passando de incolor a roxo (JOHANSSON et al., 1988).

Para a confecção de uma curva padrão de sete pontos, um volume crescente de formaldeído (0 a 150 μ l) foi adicionado à placa, em duplicata. Em seguida, 20 μ l das amostras de LS foram adicionadas em cada poço, também em duplicata. Foram adicionados a todos os poços 100 μ l de tampão de amostra (*Assay Buffer*) e 30 μ l de metanol.

A reação iniciou-se depois da adição de 20 μ l de H_2O_2 a todos os poços. A placa foi então incubada por 20 minutos em temperatura ambiente, sob agitação, e a reação foi interrompida com a adição de 30 μ l de hidróxido de potássio em todos os poços, seguida da adição do *Purpald* (cromógeno).

Após incubação sob agitação por 10 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado 10 μ l de periodato de potássio. O material foi então incubado por mais cinco minutos sob agitação. Em seguida, a absorbância da amostra foi lida a 540 nm em leitor de microplaca¹⁰, e correlacionada à concentração da curva padrão pelo programa Gen5¹¹ para a obtenção da quantidade de formaldeído (μ M) produzido por cada amostra.

Para a obtenção da atividade da catalase por minuto/ml, o valor de formaldeído de cada amostra foi dividido por 20.

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

5.5.1.2 Determinação da enzima Superóxido Dismutase

As enzimas superóxido dismutases (SODs) são metaloenzimas que catalisam a dismutação de um ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo crucial para o mecanismo de defesa antioxidante celular. A quantificação da soma dos três tipos de

¹⁰ ELx808 – BioTek, Winooski, Estados Unidos

¹¹ BioTek, Winooski, Estados Unidos

superóxido dismutase (cobre/zinco, manganês e ferro) no presente estudo foi realizada utilizando-se o *kit* Superoxide Dismutase Assay (Ref.: 706002), Cayman Chemical Company (EUA). O *kit* utiliza um sal de tetrazolium para a detecção de radicais peróxido, gerados pela xantina oxidase e hipoxantina (SUN; OBERLEY; LI, 1988). Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para exibir 50% de dismutação do radical peróxido

Uma curva de sete pontos, com volume crescente de solução padrão contendo SOD, foi adicionada à placa de 96 poços em duplicata. Em seguida, 10 µl das amostras de LS foram adicionadas em cada poço, também em duplicata. Foram adicionados a todos os poços 200 µl de *Radical Detector* (sal de tetrazólio). A reação iniciou-se após a adição de 20 µl de Xantina Oxidase a cada poço.

Como as amostras possuíam coloração variada, seguimos a recomendação do fabricante do teste e processamos um controle de fundo de cada amostra substituindo a adição de xantina oxidase por *Sample Buffer*.

A placa foi então incubada, sob agitação por 20 minutos em temperatura ambiente e após este período a absorbância da amostra foi lida à 440 nm em leitor de microplaca¹² e correlacionada à concentração da curva padrão pelo programa Gen5¹³. Para obtenção da concentração final de SOD (U/ml), valor obtido de cada amostra incubada com xantina oxidase foi subtraído pelo valor obtido da mesma amostra incubada com *Sample Buffer*.

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

5.5.1.3 Determinação da atividade da enzima Glutathione Peroxidase

A atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) pode ser medida indiretamente por uma reação conjugada com a glutathione redutase, que transforma a glutathione oxidada, produzida na redução do H₂O₂, em glutathione reduzida. A oxidação do NADPH a NADP⁺ é acompanhada por uma diminuição na absorbância a 340nm (PAGLIA; VALENTINE, 1967).

A GPx catalisa a redução de hidroperóxidos, incluindo o peróxido de hidrogênio, protegendo a célula do dano oxidativo.

¹² ELx808 – BioTek, Winooski, Estados Unidos

¹³ BioTek, Winooski, Estados Unidos

A cinética da atividade da GPx no LS foi realizada pelo *kit* Glutathione Peroxidase Assay Kit (Ref.: 703102), Cayman Chemical Company (EUA).

O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços, onde 20 µl de cada amostra foram adicionados por poço, em duplicata. Em seguida, foram adicionados 100 µl de *Assay Buffer* (tampão de amostra) e 50 µl de Co-substrato (contendo NADPH, glutathiona e glutathiona redutase). A reação inicia-se após a adição de 20 µl de hidroperóxido de cumeno.

A placa foi então posicionada no leitor de microplaca¹⁴ e a absorbância lida a cada minuto, por 6 minutos, no comprimento de onda de 340 nm.

Foram analisados simultaneamente, em todas as placas utilizadas, 2 poços com controle de fundo (poços sem adição de enzima) e dois poços para controle do teste com 20 µl de GPx controle.

Os valores de absorbância obtidos com a cinética de cada amostra foram plotados em um gráfico e, com a fórmula da reta obtida, foi calculada a atividade de GPx em cada minuto e o Δ atividade/minuto ($\Delta A_{340}/\text{min}$).

Após a obtenção de valores, a atividade da GPx em nmol/min/ml foi obtida com a seguinte equação:

$$\text{Atividade de GPx (nmol/min/ml)} = (\Delta A_{340}/\text{min}/0,00622 \mu\text{M}^{-1}).(0,19/0,02)$$

A atividade total considerada por amostra foi a média da atividade dos três primeiros minutos da reação.

5.5.1.4 Determinação da Capacidade Antioxidante Total

A quantificação da capacidade antioxidante total no LS foi realizada pelo *kit* Antioxidant Assay Kit (Ref.: 709001), Cayman Chemical Company (EUA).

A cooperação entre os diferentes sistemas antioxidantes fornece maior proteção contra o ataque de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, do que qualquer sistema isoladamente. O ensaio utilizado representa o efeito cumulativo de todos os antioxidantes presentes na amostra avaliada em inibir a oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenztiazolina-6-

¹⁴ ELx808 – BioTek, Winooski, Estados Unidos

sulfônico]) em ABTS^{•+} pela metamioglobina. A capacidade dos antioxidantes da amostra em prevenir a oxidação do ABTS é comparada com a do Trolox, um análogo hidrossolúvel do tocoferol, e é quantificada como milimolar de equivalentes de Trolox.

Uma curva de sete pontos, com volume crescente de solução padrão contendo Trolox, foi adicionada à placa de 96 poços em duplicata. Em seguida, 10 µl das amostras de LS foram adicionadas em cada poço, também em duplicata. Foram adicionados a todos os poços 10 µl de Metamioglobina e 150 µl de ABTS (cromógeno). A reação iniciou-se após a adição de 40 µl de peróxido de Hidrogênio à cada poço.

A placa foi então incubada, sob agitação por 5 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, a absorbância das amostras foi lida no comprimento de onda de 405 nm em leitor de microplaca¹⁵ e a Capacidade Antioxidante (mM) foi obtida após a correlação do valor da densidade óptica das amostras à concentração da curva padrão pelo programa Gen5¹⁶.

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

5.5.1.5 Determinação da Vitamina E

A vitamina E do LS foi quantificada pelo método de ELISA com o *kit* γ -CEHC EIA Kit (Ref.: 10010621), Cayman Chemical Company (EUA).

O γ -CEHC [2,7,8-trimetil-2-(β -carboxietil)-6-hidroxicroman] é o metabólito predominante do γ -tocoferol produzido no fígado, através da ação do citocromo P450. O α e γ tocoferol são formas de vitamina E com propriedades antioxidantes. O γ -tocoferol aprisiona os radicais de óxido nítrico e intermediários secundários reativos derivados de NO_x.

O teste utilizado no presente estudo é um ensaio competitivo para quantificar o γ -CEHC em placa de 96 poços, pré-tratada com anticorpo monoclonal anti-IgG de coelho feito em camundongo. Neste ensaio, o tampão de amostra (*EIA Buffer*) foi adicionado aos poços de ligação inespecífica (100 µl) e aos poços de máxima ligação (50 µl). A curva padrão foi feita em duplicata utilizando-se oito pontos com concentração entre 20.000 e 32,8 pg/ml de γ -CEHC. Em seguida, 50 µl das amostras de LS foram adicionadas em cada poço, em duplicata.

¹⁵ ELx808 – BioTek, Winooski, Estados Unidos

¹⁶ BioTek, Winooski, Estados Unidos

Com exceção dos poços de atividade total e branco, todos os demais receberam 50 µl do conjugado γ -CEHC - acetilcolinesterase (AChE) (γ -CEHC tracer). O anti-soro de γ -CEHC foi adicionado na quantidade de 50 µl aos poços, com exceção dos poços de atividade total, ligação inespecífica e branco. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C e em seguida lavada¹⁷ cinco vezes com *Wash Buffer*. Foram adicionados 200 µl de substrato para AChE (*Ellman's Reagent*), preparado imediatamente antes de sua utilização, em todos os poços, e apenas o poço de atividade total recebeu também 5 µl de γ -CEHC tracer. A placa foi protegida da luz e mantida no agitador¹⁸ por 90 a 120 minutos. A absorbância da amostra foi lida à 405 nm em leitor de microplaca¹⁹ e correlacionada à concentração da curva padrão pelo programa Gen5²⁰.

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

5.5.1.6 Determinação dos grupos proteína carbonil

A proteína carbonil é o marcador mais comumente utilizado para avaliar a oxidação de proteínas. No presente estudo, a quantificação da proteína carbonil no LS foi realizada pelo *kit* Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit (Ref.: 10005020), Cayman Chemical Company (EUA).

Cada amostra (200 µl) foi transferida para dois tubos: *sample* (S) e *control* (C). Inicialmente, 800 µl de DNPH (2,4- dinitrofenilhidrazina) foram adicionados às amostras dos tubos (S) e 800 µl de ácido clorídrico 2,5M foram adicionados às amostras dos tubos (C). Em seguida, os tubos foram incubados por uma hora, protegidos da luz e seu conteúdo homogeneizado a cada 15 minutos. Após a incubação, 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 20% foi adicionado aos tubos (S) e (C). Os tubos foram mantidos por cinco minutos no gelo.

Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e 1 ml de TCA 10% foi adicionado aos tubos. Após descanso de cinco minutos no gelo, os tubos foram novamente centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C.

¹⁷ 405 LS – BioTek, Winooski, Estados Unidos

¹⁸ Mini Shaker PSU-2T – Biosan, Belo Horizonte, Brasil

¹⁹ ELx808 – BioTek, Winooski, Estados Unidos

²⁰ BioTek, Winooski, Estados Unidos

O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspensionado em 1 ml de solução etanol/etilacetato (1:1) e os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. Este procedimento foi repetido por mais oito vezes.

Após a lavagem final, os *pellets* de proteína foram ressuspensionados em 500 µl de hidrocloreto de guanidina. Os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C e 220 µl de cada tubo foi adicionado, em duplicata, a uma placa de 96 poços.

Em seguida, a absorbância da amostra foi lida no comprimento de onda de 370 nm em leitor de microplaca²¹ e correlacionada à concentração da curva padrão pelo programa Gen5²². A média de cada amostra (S) e (C) foi calculada, e a absorbância média da amostra (C) foi subtraída da absorbância média (S) da amostra correspondente para obtenção da absorbância corrigida (AC). A concentração de proteína carbonil (nmol/ml) de cada amostra avaliada foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Proteína Carbonil (nmol/ml)} = [(AC)/(0,022 \mu\text{M}^{-1})](500 \mu\text{l} / 200 \mu\text{l})$$

As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP e a leitura foi realizada no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor, no Instituto de Ciências Biomédicas III, Departamento de Anatomia.

5.5.2 Análise Física e Celular do líquido sinovial

5.5.2.1 Viscosidade

O LS foi analisado *in natura* quanto à viscosidade colocando-se uma gota da amostra sobre o dedo polegar. Com o dedo indicador foi realizado movimento de pinça e o fio formado pelo LS foi classificado como bom (>5 cm), regular (2 a 5 cm) ou ruim (<2 cm) (VAN PELT, 1974). A esta avaliação foram atribuídos os seguintes escores: viscosidade boa=1; viscosidade regular =2 e viscosidade ruim=3.

²¹ Epoch Microplate Spectrophotometer – BioTek, Winooski, Estados Unidos

²² BioTek, Winooski, Estados Unidos

5.5.2.2 Teste do Precipitado de Mucina

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

5.5.2.3 Contagem Total de Células

A contagem total de células nucleadas foi realizada em câmara de Neubauer²³, com alíquotas de líquido sinovial *in natura*. As amostras contaminadas com sangue foram diluídas na proporção de 10 µl de LS para 90 ou 190 µL de solução fisiológica 0,9%, e o número de células viáveis foi ajustado para x10 e x20, respectivamente.

5.5.3 Determinação dos Glicosaminoglicanos

Para a determinação de GAGs no LS, 50 µl de cada amostra foram adicionados a 100 µl de protease alcalina P126 maxatase (4 mg/ml Tris HCl 0,05 M) e incubados em banho-maria a 50°C, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram fervidas durante 15 minutos e centrifugadas²⁴ em temperatura ambiente a 3000 x g por 15 minutos para a remoção de resíduos insolúveis. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 600 µl e seco em vácuo²⁵ por pelo menos 2 horas, a 45°C. As amostras foram ressuspensas em 25 µl de água destilada.

²³ Neubauer – Hirschmann – EM – Techcolor, Eberstadt, Alemanha

²⁴ Centrífuga 5417 R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha

²⁵ Vacufuge vaccum concentrator – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha

As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose, em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05 M e pH 9 (PDA), em cuba refrigerada, por aproximadamente uma hora, como descrito por JAKES et al., (1968) e modificado por DIETRICH; DIETRICH (1976). Foram utilizados 5 µl de um padrão de CS e de um padrão de AH, ambos na concentração de 1 mg/ml. O corante vermelho de cresol foi adicionado como indicador da distância percorrida. Após a eletroforese, os GAGs foram fixados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1%, pelo tempo mínimo de duas horas. Em seguida, o gel foi coberto com papel filtro e seco sob corrente de ar aquecida. O CS foi corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1% em etanol 50%, por 15 minutos. O excesso de corante foi removido pela mesma solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Ato contínuo, o AH foi corado com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M, pH 5, por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M como descrito por Machado et al. (2012).

As lâminas foram escaneadas²⁶ e as imagens editadas²⁷ para análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas²⁸.

5.5.4 Biomarcadores Inflamatórios

5.5.4.1 Determinação da PGE₂

A quantificação de PGE₂ do LS foi realizada por ELISA, com o *kit* Prostaglandin E₂ EIA Kit – Monoclonal (Ref.: 514010), Cayman Chemical Company (EUA).

O tampão de amostra (*EIA Buffer*) foi adicionado aos poços de ligação inespecífica (100 µl) e aos poços de máxima ligação (50 µl). A curva padrão foi feita em duplicata utilizando-se oito pontos em diluição seriada com concentração entre 1.000 e 7,8 pg/ml de PGE₂. Em seguida, 50 µl das amostras de LS foram adicionadas em cada poço, em duplicata. Com exceção dos poços de atividade total e branco, todos os demais receberam 50 µl do conjugado PGE₂- acetilcolinesterase (AChE) (*PGE₂ tracer*). O anticorpo monoclonal anti-

²⁶ Epson Expression 1680 – Suwa, Japão

²⁷ Laund Silver Fast Epson IT8 – Suwa, Japão

²⁸ Lauch VisionWorks LS – UVP, Upland, Canada

PGE₂ foi adicionado na quantidade de 50 µl aos poços, com exceção dos poços de atividade total, ligação inespecífica e branco. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C e em seguida lavada²⁹ cinco vezes com *Wash Buffer*. Foram adicionados 200 µl de substrato para AChE (*Ellman's Reagent*), preparado imediatamente antes de sua utilização, em todos os poços, e apenas o poço de atividade total recebeu também 5 µl de PGE₂ *tracer*. A placa foi protegida da luz e mantida no agitador³⁰ por 60 a 90 minutos. A absorbância da amostra foi lida à 405 nm em leitor de microplaca³¹ e correlacionada à concentração da curva padrão pelo programa Gen5³². Foram utilizadas duas amostras de LS de articulações com artrite séptica para validação do teste.

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

5.5.4.2 Determinação da Proteína Total

A dosagem da proteína total do LS foi realizada pelo método do biureto, com a utilização do analisador bioquímico automático³³.

5.5.5 Determinação da Ureia

Para correção da diluição das amostras, foi realizada a dosagem de ureia do LS pelo método enzimático uréase-glutamato-desidrogenase, com a utilização do analisador bioquímico automático³⁴.

5.5.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram avaliados segundo a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quando necessário retirou-se *outliers* para que a distribuição dos dados alcançasse a normalidade; em seguida utilizou-se modelo de análise de variância (ANOVA) para

²⁹ 405 LS – BioTek, Winooski, Estados Unidos

³⁰ Mini Shaker PSU-2T – Biosan, Belo Horizonte, Brasil

³¹ ELx808 – BioTek, Winooski, Estados Unidos

³² BioTek, Winooski, Estados Unidos

³³ RX Daytona – Randox, Antrim, Reino Unido

³⁴ RX Daytona – Randox, Antrim, Reino Unido

verificar o efeito de grupos e momentos. Para os dados paramétricos utilizou-se o teste T Student, e para os dados não paramétricos Wilcoxon.

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

6 RESULTADOS

6.1 ANIMAIS

No grupo COA, a média de idade dos animais foi de 5 anos. O peso corporal médio foi de 510,6 kg e a maioria dos animais (80%) era da raça BH. No grupo POA, a média de idade dos animais foi de 6 anos e o peso médio de 532,5 kg.

No grupo COC, a média de idade dos animais foi de 3,9 anos, o peso médio foi de 467,5 kg e a maioria dos animais (83,3%) era da raça PSL. No grupo POC, a idade média foi de 3,2 anos e o peso corporal médio foi de 497,7 kg.

A articulação mais frequentemente acometida por OCD foi a tíbio-társica. Das 19 articulações acometidas por OCD estudadas, 15 eram tíbio-társicas (78,9%), três eram articulações metacarpo-falangeanas (15,84%) e uma articulação interfalangeana distal (5,26%). Das articulações acometidas por OA, 10 eram tíbio-társicas (62,5%), três eram fêmoro-tíbio-patelares (18,75%), duas eram rádio-carpo-metacarpianas (12,5%) e uma articulação metacarpo-falangeana (6,25%).

Tanto na OA como na OCD o número de machos acometidos foi maior que o número de fêmeas. Todos os equinos dos grupos OA eram machos, e nos grupos OC 83,3% dos equinos eram machos.

6.2 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL

A análise estatística revelou que os grupos controle e tratamento eram homogêneos em todos os parâmetros avaliados no momento 0h, tanto na OA como na OCD. Os resultados referentes às concentrações de CS, AH, PGE₂, proteína total, proteína carbonil, SOD, TAC e CECH foram corrigidos pela concentração de ureia no líquido sinovial.

6.2.1 Avaliação do estado redox

6.2.1.1 A atividade da Catalase

Em relação aos sistemas enzimáticos antioxidantes, a atividade da catalase aumentou em função do ato cirúrgico e do tratamento com PPA ($p < 0,05$), nos grupos controles da OA e OCD ($p < 0,05$) (Gráficos 1 e 2). Estes incrementos foram de magnitude equivalente. Os dados referentes à atividade da catalase encontram-se no apêndice A, tabelas 1- 4.

Gráfico 1 – Atividade média e erro padrão da Catalase (nmol/min/mL) no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 2 – Atividade média e erro padrão da Catalase (nmol/min/mL) no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Comparando-se as enfermidades articulares, a atividade da catalase foi maior na OA ($p < 0,05$) (Gráfico 3). Os valores referentes à comparação da atividade na OA e na OCD da catalase no momento 0 hora encontram-se no apêndice A, tabela 5.

Gráfico 3 – Atividade média e erro padrão da Catalase (nmol/min/mL) no líquido sinovial coletado das articulações acometidas por OA e OCD às 0 horas – São Paulo – 2013

6.2.1.2 A Superóxido Dismutase

O segundo sistema antioxidante estudado foi o da SOD. Não foram demonstradas alterações em suas concentrações no decorrer dos experimentos, nem em função do ato cirúrgico, nem em função do tratamento com PPA, nas articulações observadas (Gráficos 4 e 5). Os dados referentes aos valores das concentrações da SOD encontram-se no apêndice B, tabelas 6-9.

Gráfico 4– Concentração média e erro padrão de SOD/Ureia (U/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 5 – Concentração média e erro padrão da SOD/Ureia (U/mg) no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

A concentração de SOD mostrou-se equivalente no líquido sinovial das articulações dos grupos OA e OC no momento 0 horas. Os valores referentes às concentrações da SOD nas duas enfermidades, no momento 0 hora, encontram-se no apêndice B, tabela 10.

6.2.1.3 A atividade da Glutathiona Peroxidase

A terceira enzima antioxidante pesquisada foi a GPx. Em todas as articulações observadas houve aumento de sua atividade após o ato cirúrgico, porém de maneira não significativa. O tratamento com PPA também incrementou a atividade da GPx, de forma

igualmente não significativa (Gráficos 6 e 7). Os valores referentes à atividade da GPx encontram-se no apêndice C, tabelas 11 - 14.

A atividade da GPx mostrou-se equivalente no líquido sinovial das articulações afetadas por OA e OCD, com tendência a valores maiores na OCD. Os valores referentes à atividade da GPx na OA e na OCD, no momento 0 hora, encontram-se no apêndice C, tabela 15.

Gráfico 6 – Atividade média e erro padrão de Glutathione Peroxidase (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 7 – Atividade média e erro padrão de Glutathione Peroxidase (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

6.2.1.4 A Capacidade Antioxidante Total

O teste de mensuração da TAC no líquido sinovial, não revelou alterações significativas, nem em relação ao procedimento cirúrgico, nem em relação ao tratamento com PPA (Gráficos 8 e 9). Os valores referentes às concentrações de TAC nos grupos controle e

tratamento, nas duas enfermidades, encontram-se no apêndice D, tabelas 16 - 19. Não houve diferença entre os valores de TAC dos grupos controle para as duas enfermidades. Os valores referentes à TAC no momento 0 hora encontram-se no apêndice D, tabela 20.

Gráfico 8 – Concentração média e erro padrão de TAC/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 9 – Concentração média e erro padrão de TAC/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupo osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo condicionado (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

6.2.1.5 A Vitamina E

O sistema antioxidante não enzimático pesquisado foi a vitamina E, através das concentrações de CEHC no líquido sinovial das articulações acometidas por OA e OCD. As concentrações de CEHC não se alteraram após o ato cirúrgico, mas aumentaram após a administração do PPA ($p < 0,05$) (Gráficos 10 e 11). Os valores referentes a estes grupos encontram-se no apêndice E, tabela 21 - 24.

Gráfico 10 – Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 11 – Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Observando os valores basais em todos os animais controle foi possível detectar diferença significativa entre a concentração de CEHC no líquido sinovial das articulações afetadas por OA e OCD, com valores menores encontrados nesta última (Gráfico 12). Os valores referentes às concentrações de CEHC na OA e na OCD encontram-se no apêndice E, tabela 25.

Gráfico 12 – Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/mg) no líquido sinovial coletado das articulações acometidas por OA e OCD às 0 horas – São Paulo – 2013

6.2.1.6 Os grupos proteína carbonil

Enquanto biomarcador de estresse oxidativo, a concentração de grupos proteína carbonil não apresentou alterações às 48 horas do período pós-operatório dos grupos controle. A concentração de proteína carbonil apresentou-se significativamente aumentada no líquido sinovial das articulações do grupo OA após o tratamento com PPA ($p < 0,05$) (Gráficos 13 e 14). Os valores referentes às concentrações de grupos carbonil nos grupos controle e tratamento, nas duas enfermidades, encontram-se no apêndice F, tabelas 26 -29.

Gráfico 13 – Concentração média e erro padrão de Proteína Carbonil/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 14 – Concentração média e erro padrão de Proteína Carbonil/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

A comparação dos valores basais dos grupos controle revelou concentrações equivalentes deste biomarcador de estresse oxidativo na OA e OCD. Os valores referentes às concentrações de proteína carbonil nos grupos controles da OA e da OCD, momento 0 hora, encontram-se no apêndice F, tabela 30.

6.2.2 Análise física e celular do líquido sinovial

6.2.2.1 Viscosidade

A avaliação da viscosidade do líquido sinovial não apresentou variações em função do ato cirúrgico. Contudo, 48 horas após o tratamento com PPA, os escores para viscosidade pioraram em ambas enfermidades ($p < 0,05$) (Gráficos 15 e 16). Os valores referentes à viscosidade dos grupos controles e dos tratados encontram-se no apêndice G, tabelas 31-34.

Gráfico 15 – Viscosidade do líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

1= viscosidade boa (>5); 2= viscosidade intermediária (2,5 a 5); 3= viscosidade ruim (<2)

Gráfico 16 – Viscosidade do líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

1= viscosidade boa (>5); 2= viscosidade intermediária (2,5 a 5); 3= viscosidade ruim (<2)

A viscosidade do líquido sinovial não diferiu no momento 0 hora, na OA e na OCD. Os valores referentes à viscosidade neste momento encontram-se no apêndice G, tabela 35.

6.2.2.2 Teste do Precipitado de Mucina

Na OA, tanto o procedimento cirúrgico como o tratamento com PPA resultaram em piora nos escores do teste do coágulo de mucina ($p < 0,05$). Na OCD, o teste não apresentou variação no período pós-operatório, nos animais tratados e nos animais controles (Gráficos 17 e 18). De forma similar, o teste não revelou diferença entre as enfermidades OA e OCD. Os valores referentes aos escores para o teste do precipitado de mucina encontram-se no apêndice H, tabelas 36-40.

Gráfico 17 – Qualidade do precipitado de mucina do líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

1= ótima; 2= boa; 3= regular; 4= ruim

Gráfico 18 – Qualidade do precipitado de mucina do líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

1= ótima; 2= boa; 3= regular; 4= ruim

6.2.2.3 Contagem total de células nucleadas

O número de células no líquido sinovial aumentou em função do procedimento cirúrgico ($p < 0,05$) e do tratamento com PPA nas duas enfermidades ($p < 0,05$) (Gráficos 19 e 20).

Gráfico 19 – Contagem total de células nucleadas no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) e tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 20 – Contagem total de células nucleadas no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) e tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

A contagem total de células nucleadas apresentou-se maior nas articulações acometidas por OA no momento 0 horas, quando comparada à da OCD (Gráfico 21). Os valores referentes a estas contagens encontram-se no apêndice I, tabela 41.

Gráfico 21 – Contagem total de células nucleadas totais no líquido sinovial coletado das articulações acometidas por OA e OCD às 0 horas – São Paulo – 2013

6.2.3 Identificação e quantificação de glicosaminoglicanos

A identificação de GAGs no líquido sinovial das articulações dos grupos controle e tratamento, na OA e na OCD, foi realizada através da eletroforese em gel de agarose, tampão PDA, como descrito em métodos. As Figuras 1 e 2 mostram géis representativos.

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose de GAGs do líquido sinovial de articulações dos grupos controle de OA e OC (COA e COC) e de articulações com OA e OCD tratadas com PPA (POA e POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013 CS: condroitim sulfato; AH: ácido hialurônico; P1: AH padrão, 5 µg; P2: CS padrão, 5 µg.

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose de GAGs do líquido sinovial de articulações do grupo de articulações com OCD tratadas com PPA (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013. CS: condroitim sulfato; AH: ácido hialurônico; P1: AH padrão, 10 µg; P2: CS padrão, 5 µg.

6.2.3.1 Quantificação do Condroitím Sulfato

As concentrações de condroitim sulfato no líquido sinovial das articulações acometidas por OA e OCD aumentaram após a realização do ato cirúrgico ($p < 0,05$). O tratamento das articulações afetadas por OA e OCD com o PPA não exerceu nenhum efeito sobre as concentrações de CS no líquido sinovial, dentro do período de 48 horas em que foi realizada a coleta (gráficos 22 e 23). Os valores referentes às concentrações de CS encontram-se no apêndice J, tabelas 42 - 45.

Gráfico 22 – Concentração média e erro padrão de CS/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo condicionado (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 23 – Concentração média e erro padrão de CS/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo condicionado (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Comparando-se as concentrações de CS no líquido sinovial das articulações dos grupos controles da OA e OCD às 0h foi possível observar que na OCD elas apresentaram-se

maiores ($p < 0,05$) do que no grupo OA. Estes valores estão representados no gráfico 26, juntamente com os valores das concentrações de ácido hialurônico. Os valores referentes às concentrações de CS no líquido sinovial dos grupos controle às 0 horas, na OA e na OCD, encontram-se no apêndice J, tabela 46.

6.2.3.2 Quantificação do Ácido Hialurônico

Em relação às concentrações de ácido hialurônico, não houve variação em função do ato cirúrgico. O tratamento com PPA não afetou a concentração de AH na OA, porém diminuiu a concentração de AH no líquido sinovial das articulações afetadas por OCD ($p < 0,05$) (gráficos 24 e 25). Os valores referentes às concentrações de AH encontram-se no apêndice L, tabelas 47- 50.

Gráfico 24 – Concentração média e erro padrão de AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo condicionado (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 25 – Concentração média e erro padrão de AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Na comparação entre as afecções, as concentrações de AH foram maiores nas articulações acometidas por OCD ($p < 0,05$) (Gráfico 26). Os valores referentes às concentrações de AH na OA e na OCD no momento 0 horas encontram-se no apêndice L, tabela 51.

Gráfico 26 – Concentração média e erro padrão de CS($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) e AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações com osteocondrite dissecante (OCD) e osteoartrite (OA) às 0 horas – São Paulo – 2013

6.2.4 Biomarcadores Inflamatórios

6.2.4.1 Determinação da Prostaglandina E₂

As concentrações de PGE₂ não sofreram variações, nem em decorrência do ato cirúrgico, nem em decorrência do tratamento com o hemoderivado, tanto na OA como na OCD (Gráficos 27 e 28). Os valores referentes às concentrações de PGE₂ encontram-se no apêndice M, tabelas 52-55.

Gráfico 27 – Concentração média e erro padrão de PGE₂/Ureia (pg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 28 – Concentração média e erro padrão de PGE₂/Ureia (pg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteocondrose controle (COC) e osteocondrose tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

As concentrações de PGE₂ apresentaram-se mais elevadas no líquido sinovial de articulações afetadas pela OA, quando comparadas às concentrações das articulações do grupo OC ($p < 0,05$). (gráfico 29). Os dados referentes às concentrações de PGE₂ encontram-se no apêndice M, tabela 56.

Gráfico 29 – Concentração média e erro padrão de PGE_2 (pg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações com osteocondrite dissecante (OCD) e osteoartrite (OA) às 0 horas – São Paulo – 2013

6.2.4.2 Determinação da Proteína Total

As concentrações de proteína total no líquido sinovial aumentaram no grupo COC, em função do ato cirúrgico, e no grupo OA após o tratamento com PPA ($p < 0,05$) (gráficos 30 e 31). Os valores referentes às concentrações de proteína total nos grupos controle e tratado, nas duas enfermidades, encontram-se no apêndice N, tabelas 57 - 60.

Gráfico 30 – Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações dos grupos osteoartrite controle (COA) e osteoartrite tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 31 – Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) e tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Na comparação entre as concentrações de proteína total no líquido sinovial da OA e da OCD, no momento 0 horas, os valores foram superiores no grupo OA ($p < 0,05$) (Gráfico 32). Os valores referentes à comparação entre a OA e a OCD encontram-se no apêndice N, tabela 61.

Gráfico 32 – Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações com osteocondrite dissecante (OCD) e osteoartrite (OA) às 0 horas – São Paulo – 2013

6.2.5 Determinação da Ureia

As concentrações de ureia não se alteraram em função do procedimento cirúrgico. O tratamento com PPA diminuiu as concentrações de ureia nas articulações afetadas pela OA ($p < 0,05$) e aumentou a concentração de ureia nas articulações afetadas pela OCD ($p < 0,05$)

(Gráficos 33 e 34). Os valores referentes a ureia nos grupos controle e tratamento, nas duas enfermidades, encontram-se no apêndice O, tabelas 62 - 65.

As concentrações basais de ureia foram equivalentes nas articulações acometidas pelas duas enfermidades, no momento 0h. (apêndice O, tabela 66).

Gráfico 33 – Concentração média e erro padrão de Ureia (mg/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) e tratado (POA) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Gráfico 34 – Concentração média e erro padrão de Ureia (mg/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) e tratado (POC) com plasma processado autólogo (PPA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram a ocorrência de estresse oxidativo no período pós-operatório, através do aumento da atividade da catalase no LS, tanto nas articulações acometidas por OA como naquelas acometidas por OCD. O aumento da atividade da catalase indica a ativação do sistema de defesa antioxidante, em resposta ao desequilíbrio redox, desencadeado pela intervenção cirúrgica.

Rossetti et al. (2012) verificaram a explosão respiratória (ou *burst* oxidativo) no LS de equinos hígidos, 48 horas após a realização de artroscopia, através do emprego de citometria de fluxo. Estes autores demonstraram que o fenômeno decorreu da ativação das células polimorfonucleares e mononucleares. De maneira similar, a ocorrência do estresse oxidativo responsável pelo aumento da atividade da catalase aqui observado deve-se, em grande parte, à presença de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e monócitos ativados no LS, no período pós-cirúrgico imediato. Estas células constituem-se em uma das principais fontes de oxidantes, produzindo EROs através da ação da NADPH oxidase (HALLIWELL et al., 1988; DAHLGREN; KARLSSON, 1999). Estando presentes em número aumentado no LS no período pós-operatório, elas certamente foram responsáveis pela maior parte das EROs geradas. Arai (1967) demonstrou a correlação positiva entre o número de leucócitos no LS e a atividade da catalase, atribuindo o aumento de sua atividade ao aumento do número de leucócitos no LS. Os condrócitos são fontes adicionais de EROs, conforme demonstrado *in vitro* por Wientjes e Segal (1995) e Tikun, Yan e Chen (1998). Estes últimos autores demonstraram que em condições adversas, os condrócitos são capazes de produzir radicais peróxido e peróxido de hidrogênio, podendo ter contribuído para a ocorrência do estresse oxidativo, neste experimento.

Além dos fagócitos ativados e dos condrócitos, é provável que a presença da hemoglobina proveniente de eritrócitos rompidos no LS, nas 48 horas seguintes ao procedimento cirúrgico tenha contribuído para a peroxidação de lipídeos, na presença de H_2O_2 . O excesso de H_2O_2 , por sua vez, é capaz de causar posterior degradação da hemoglobina, liberando íons ferro e estimulando ainda mais a formação de radicais hidroxila (GUTTERIDGE, 1986; IVANOVA; IVANOV, 2000). Todas as amostras de LS obtidas às 0 horas apresentaram coloração amarelo palha, antes e após a centrifugação, não indicando a contaminação com hemácias ou ocorrência de hemólise. Contudo, as coletas realizadas 48

horas após a artroscopia resultaram na recuperação de LS de coloração avermelhada, indicando presença de hemácias ou hemólise. Após a centrifugação para obtenção do sobrenadante, estas amostras apresentaram apenas discreta alteração de coloração, mas a presença de hemoglobina pode ter interferido com as leituras (ARAI, 1967). O escape de sangue para o interior da cavidade articular é de difícil prevenção, não apenas durante a realização da artroscopia e no período pós-operatório imediato, mas também durante a realização das artrocenteses, tendo consistido numa das limitações deste estudo. Rossetti et al. (2012) também verificaram que o líquido articular de equinos submetidos à artroscopia apresentava coloração avermelhada e maior concentração de hemoglobina, 48 horas após a realização do ato cirúrgico. Os autores atribuíram estes achados ao sangramento intra-articular decorrente do procedimento e à distensão da cavidade articular com soro Ringer lactato, necessária para a realização do mesmo. Bertone et al. (1986) observaram efeitos similares sobre o aspecto do LS em consequência à lavagens articulares, com o emprego de diferentes soluções.

A despeito de sua origem, o aumento da produção de EROs no período pós-operatório ficou aqui caracterizado pelo aumento da atividade da catalase. A ativação de sistemas enzimáticos antioxidantes é oportuna neste período, em contraposição aos efeitos deletérios das EROs geradas (ROSSETTI et al., 2012). Não existem na literatura dados relativos à ativação de sistemas enzimáticos antioxidantes no LS após a realização de artroscopias. Contudo, esta ativação foi verificada no soro por Olszewska-Stonina et al. (2010), que verificaram a ocorrência de estimulação das defesas antioxidantes, no período pós-operatório, em pacientes com OA de joelho e quadril.

Na comparação entre a OA e a OCD, a atividade da catalase apresentou-se mais aumentada na OA, refletindo maior ativação das defesas antioxidantes nesta enfermidade. Este dado sugere uma depleção relativa dos mecanismos de defesa antioxidantes na OCD, e maior vulnerabilidade em relação aos efeitos deletérios das EROs, em relação a OA. (MCCORD, 1974). Desta forma, as articulações acometidas pela OCD seriam as mais beneficiadas pela adoção de medidas terapêuticas que visassem a restauração do equilíbrio redox, como por exemplo, a administração de antioxidantes.

A atividade da catalase no LS das articulações acometidas por OA e OCD aumentou também no grupo tratado com PPA. Este aumento, contudo, deu-se de maneira equivalente ao observado em função do ato cirúrgico, não refletindo um efeito benéfico relacionado particularmente ao emprego do hemoderivado.

Existem resultados controversos em relação à atividade da catalase no LS durante o curso das enfermidades articulares. Biemond, Swaak e Koster (1984) detectaram atividade aumentada da catalase no LS de pacientes humanos acometidos por artrite reumatoide e Arai (1967) demonstrou aumento semelhante no LS de pacientes portadores de várias artropatias, dentre elas a artrite reumatoide e a OA. Já Ostalowska et al. (2007) não detectaram atividade da catalase em pacientes humanos com artrite pós-traumática de joelho, e Blake et al. (1981) detectaram mínima atividade da catalase no LS de portadores de artrite reumatoide. Um igual número de estudos realizados em pacientes humanos portadores de OA reportaram atividades reduzidas da catalase no LS (SCHUMACHER, 1997; IVANOVA; IVANOV, 2000).

Quando verificada em outros meios, que não o LS, a atividade da catalase em portadores de artropatias apresentou-se consistentemente diminuída. No hemolisado do sangue de portadores de OA, Maneesh et al. (2005), Sarban et al. (2005) e Mohan Surapaneni e Venkataramana (2007) reportaram atividade reduzida da catalase. Em explantes de cartilagem de ratos, Jallali et al. (2005) demonstraram declínio da atividade da catalase, associado ao aumento da idade destes animais. Em explantes de cartilagem bovina tratados com IL-1 β , Mathy-Hartet et al. (2008) detectaram diminuição da expressão genética da catalase. No soro de portadores de OA, Altindag et al. (2007) encontraram diminuição da atividade da catalase, em comparação com a verificada em indivíduos saudáveis.

Os outros sistemas antioxidantes enzimáticos pesquisados no LS, a SOD e a GPx, não apresentaram alterações na OA nem na OCD, quer seja em função do tratamento com o PPA ou do procedimento cirúrgico. Esta indiferença indica que as intervenções, cirúrgica e terapêutica, não tenham causado alteração no equilíbrio redox relacionadas a estes sistemas enzimáticos em particular. Ainda, a SOD e a GPx podem não ter sido ativadas uma vez que outros sistemas de defesa contra as EROs, como por exemplo o da catalase, já se encontravam ativados.

No LS, Biemond, Swaak e Koster (1984) encontraram resultados semelhantes aos deste estudo em relação à SOD e a GPx, quando observaram indivíduos acometidos por artrite reumatoide. Sutipornpalangkul et al. (2009) também não verificaram alterações nas concentrações de SOD e GPx em pacientes humanos portadores de OA e nem naqueles que haviam sofrido trauma articular. O mesmo foi verificado por Marklund, Bjelle e Elmqvist (1986) em relação à SOD, em pacientes com artropatias reativas e artrite reumatoide, em comparação com os controles, indivíduos com suspeita de lesões de meniscos e ligamentos. À semelhança do verificado em relação à catalase, resultados contraditórios também foram

reportados em relação à SOD no LS. Ostalowska et al. (2007) observaram aumento da atividade da enzima em pacientes humanos acometidos por OA, da mesma forma que fizeram Sumii et al. (1996) em indivíduos portadores de artrite reumatóide e OA. Já Güven et al. (2007) e Regan, Bowler e Crapo (2008) observaram diminuição da atividade da SOD em portadores de disfunção temporomandibular e OA de joelho, respectivamente, enquanto Blake et al. (1981) não foram capazes de detectar SOD no LS de indivíduos com artrite reumatoide.

As atividades da SOD e da GPx pesquisadas em outros meios que não o LS também revelaram resultados contraditórios. No hemolisado de portadores de OA, Mohan Surapaneni e Venkataramana (2007) demonstraram aumento das atividades de SOD e GPx, enquanto Maneesh et al. (2005) reportaram aumento apenas da SOD, com atividade da GPx diminuída. Em fragmentos de cartilagem femoral afetada por OA, Scott et al. (2010) observaram diminuição da expressão de SOD. Mathy-Hartet et al. (2008) observaram o aumento das atividades da GPx e da SOD em cultivos de cartilagem bovina, na presença de IL-1 β . Atividades inalteradas destas enzimas foram demonstradas em condrócitos obtidos de ratos de diferentes idades, conforme reportado por Jallali et al. (2005).

Comparando as atividades da SOD e da GPx na OA e na OCD, nos indivíduos dos grupos controle, não foram observadas diferenças entre as enfermidades que pudessem caracterizá-las em relação ao equilíbrio redox.

As atividades da catalase, SOD e da GPx, apesar de fundamentais para o funcionamento do sistema de defesa antioxidante celular e proteção da MEC contra os efeitos deletérios do radical peróxido e de seus derivados (AFONSO et al., 2007), ainda precisam ser melhor compreendidas nas enfermidades articulares, em suas diversas manifestações e estágios. Os resultados são conflitantes, tanto nas análises empregando LS, como naquelas realizadas em outros substratos. As inconsistências são frequentemente atribuídas aos diferentes estágios das afecções articulares no momento da coleta de material para análise (DIMOCK; SICILIANO; MCILWRAITH, 2000) e à diferença de idade dos indivíduos observados. A atividade reduzida da SOD no LS foi atribuída às manifestações mais tardias da OA por Güven et al. (2007) e Regan, Bowler e Crapo (2008), enquanto Ostalowska et al. (2006) e Ostalowska et al. (2007), atribuíram as atividades aumentadas da SOD e da GPx ao caráter agudo da enfermidade articular estudada. Em teoria, a evolução prolongada das enfermidades articulares consome os sistemas de defesa antioxidante, enquanto o processo inflamatório agudo tende a estimulá-los. Ainda, a correlação negativa entre a atividade das enzimas antioxidantes no LS e a duração da doença articular sugere que, com o curso

prolongado da enfermidade, a indução dos sistemas antioxidantes, e consequentemente a atividade das enzimas, diminua progressivamente (OSTALOWSKA et al., 2006). No presente estudo, houve considerável variação na idade com a qual os equinos acometidos por OA (2 a 14 anos) foram admitidos para tratamento. É provável que esta variação esteja associada a diferenças nos estágios e no grau de comprometimento articular dos animais estudados e, portanto, no estado redox do líquido articular analisado, contribuindo para a heterogeneidade das amostras. Adicionalmente, dificuldades na obtenção e padronização dos resultados devem-se ao fato das enzimas, em particular a SOD, serem encontradas principalmente no interior de células e tecidos, onde desempenham suas funções primordiais, sendo sua atividade enzimática e sua concentração menores e de mais difícil mensuração em fluidos extracelulares ou no plasma (MARKLUND; HOLME; HELLNER, 1982; MARKLUND, 1984; OSTALOWSKA et al., 2007).

Observando a incongruência dos resultados apresentados na literatura e a forma como têm sido interpretados, sugerimos que as dificuldades na compreensão do funcionamento dinâmico dos mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante devam-se à hipóteses construídas de forma simplista, na tentativa de explicar os eventos que envolvem o equilíbrio redox. Caso a atividade enzimática antioxidante encontre-se diminuída, a hipótese formulada é de que o sistema antioxidante em estudo tenha sido consumido pela geração prévia de EROs, e que existe maior vulnerabilidade em relação aos efeitos destas espécies. Caso a atividade enzimática apresente-se aumentada, atribui-se à ocorrência do estresse oxidativo o estímulo necessário para o incremento da produção ou para a ativação do sistema de defesa antioxidante. Sob esta ótica, presume-se que os sistemas biológicos respondem da mesma maneira à depleção de oxidantes e ao aumento de antioxidantes, e que o estresse oxidativo se limita ao dano que os radicais livres causam ao maquinário macromolecular, subestimando o papel fundamental que desempenham na sinalização intracelular. O que se deixa de considerar nestas hipóteses, ainda, é que os sistemas antioxidantes agem de forma interligada e dependem uns dos outros para a manutenção do equilíbrio redox. Eles não oscilam, necessariamente, ao mesmo tempo e na mesma direção, mas o fazem de maneira orquestrada, quando há perturbação do equilíbrio entre as reações de oxidação e redução no interior das células. Isto ocorre à semelhança do que se verifica com os vários sistemas tampão existentes no organismo, destinados à manutenção de valores de pH sanguíneo dentro de estreitos limites de normalidade. Utilizando esta analogia, proposta por Schafer e Buettner (2001), a neutralização dos excedentes oxidantes e antioxidantes se daria da mesma forma como ocorre

em um sistema equilibrado, frente a um excesso de ácido ou base, para a manutenção do pH. Tanto em relação ao pH, como em relação ao equilíbrio redox, a manutenção da eletroneutralidade é o objetivo final; ele é alcançado através da ação de diversos sistemas-tampão e de sucessivas reações de óxido-redução, respectivamente. Esta dimensão amplia consideravelmente a compreensão do equilíbrio redox e a dos resultados obtidos nos trabalhos apresentados.

A constatação direta da geração de EROs seria a forma ideal de demonstrar a ocorrência do estresse oxidativo, e o envolvimento de radicais específicos neste processo, mas dada a sua natureza fugaz e lábil, a identificação destas espécies é extremamente difícil (TIKU; YAN; CHEN, 1998). Assim sendo, as atividades das enzimas antioxidantes que catalisam as reações de neutralização das EROs servem como medida indireta dos processos a que se referem, mas devem sempre ser analisadas com cautela e sob este prisma.

Uma vez que os sistemas biológicos, inclusive o LS, dispõem de múltiplas estratégias para a manutenção do equilíbrio redox frente a condições oxidantes, a aferição da TAC apresentou-se como um conceito global e potencialmente útil. A determinação da TAC seria um auxiliar na tentativa de sintetizar a capacidade de lidar com o desequilíbrio de elétrons. No presente trabalho, as concentrações de TAC foram equivalentes nos pacientes portadores de OA e OCD, e não variaram após o procedimento cirúrgico, nem após a aplicação de PPA. Em conformidade com os efeitos antioxidantes do PPA demonstrados anteriormente (BROSSI; BACCARIN; MASSOCO, 2012), seria esperado verificar um aumento da TAC após a administração intra-articular de PPA.

Em relação ao estudo dos sistemas antioxidantes não enzimáticos, as concentrações de vitamina E apresentaram-se equivalentes nas articulações controles da OA e da OCD, também não contribuindo para a construção de um perfil antioxidante comparativo destas enfermidades. O procedimento cirúrgico não implicou em alterações nas concentrações de vitamina E no LS, nem nas articulações afetadas pela OA, nem naquelas afetadas pela OCD. Contudo, após o tratamento houve aumento das concentrações de vitamina E no LS das articulações tratadas, demonstrando o incremento dos sistemas de defesa antioxidantes não enzimáticos após a administração do PPA. O mecanismo responsável pelo aumento verificado não ficou determinado neste estudo, e deve ser investigado detalhadamente. Permanece por ser esclarecido se o hemoderivado foi capaz de induzir a síntese do antioxidante após sua injeção intra-articular, ou se a concentração de vitamina E aumentou no hemoderivado, como resultado do processamento, tendo sido detectada no LS, após sua administração.

Fairburn et al. (1992) e Sutipornpalangkul et al. (2009) encontraram níveis de vitamina E diminuídos no LS de pacientes humanos afetados pela OA, quando comparados aos de indivíduos sem doença articular, e sugeriram a suplementação com a vitamina E para o tratamento da afecção. Curiosamente, os níveis séricos de vitamina E nos portadores de OA não se encontravam diminuídos, em comparação com os do grupo controle. Este fato indica que a redução das concentrações de vitamina E seja um evento restrito ao meio intra-articular, e que reflita o consumo ou a exaustão dos sistemas de defesa antioxidante das células, na tentativa de frear ou terminar o processo de peroxidação lipídica nas enfermidades articulares (FAIRBURN et al., 1992), a despeito da manutenção de concentrações séricas normais de vitamina E. Neste contexto, o incremento da concentração intra-articular de vitamina E quer seja pela suplementação ou pelo estímulo à produção, através da administração do PPA no período pós-operatório imediato, seria indicado na proteção contra o dano oxidativo incitado pelas EROs.

A proteção antioxidante imediatamente após a ocorrência de trauma articular mostrou-se oportuna, em estudo que verificou os efeitos da suplementação com acetilcisteína em explantes osteocondrais bovinos submetidos a cargas de impacto. A administração do antioxidante imediatamente após a injúria resultou em redução na perda de proteoglicanos e morte de condrócitos, e no aumento na viabilidade destas células (MARTIN et al., 2009). Goodwin et al. (2010) também observaram efeitos positivos da rotenona, um antioxidante inibidor da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, na morte de condrócitos induzida por impacto. Estes autores demonstraram os efeitos benéficos da administração da rotenona até duas horas após a injúria mecânica, verificando a importância da redução do estresse oxidativo no período pós-traumático imediato para a viabilidade dos condrócitos.

Apesar da existência de dados na literatura (CANTER; WIDER; ERNST, 2007), algumas dúvidas permanecem em relação à capacidade da vitamina E de exercer funções antioxidantes, *in vivo*. Isto se deve a resultados divergentes em relação à suplementação com vitamina E, ao emprego de diferentes técnicas para a verificação da peroxidação lipídica - fenômeno oxidativo ao qual a ação protetora da vitamina E está associada-, à heterogeneidade do estado nutricional dos pacientes estudados e ao tipo de experimento conduzido (CHOW, 1991). A compreensão dos resultados destes estudos fica prejudicada, ainda, pela inobservância de que é necessário haver depleção de defesas antioxidantes para que a administração exógena de antioxidantes exerça influência apreciável sobre o equilíbrio redox; o estresse oxidativo pode ocorrer sem que esta depleção se verifique. Adicionalmente, as

EROs podem ativar sistemas de defesa ainda não completamente identificados e diferentes daqueles em estudo (JONES, 2006).

Dada a importância da vitamina E na preservação das propriedades da cartilagem submetida a estresses mecânicos (KAIKI et al., 1990; BANDT et al., 2002; BEECHER; MARTIN; PEDERSEN; BUCKWALTER, 2007), o emprego de uma fonte deste antioxidante é justificado e recomendado por vários autores (BANDT et al., 2002; BEECHER et al., 2007; MOHAN SURAPANENI; VENKATARAMANA, 2007; SUTIPORNPALANGKUL et al., 2009). Não obstante, a suplementação dietética com vitamina E durante seis meses não resultou em alívio de sintomas, em indivíduos portadores de OA, em estudo clínico, randomizado e controlado (BRAND et al., 2001). A falha no abrandamento da sintomatologia da OA nestes indivíduos parece estar associada à ausência de correlação entre as concentrações séricas de vitamina E e a ocorrência de enfermidades articulares e entre os níveis séricos e articulares deste antioxidante. Por outro lado, o papel da peroxidação lipídica na instalação e progressão da doença articular é incontestável (LUNEC et al., 1981; LIPPIELLO; WALSH; FIENHOLD, 1991; MERRY et al., 1991; GRIGOLO et al., 2003; SHAH; RASKA; TIKU, 2005; DAIX et al., 2007) bem como o são as evidências de prevenção da progressão da OA e da destruição da cartilagem articular, *in vivo*, (KAIKI et al., 1990; BANDT et al., 2002) associadas ao emprego da vitamina E. A possibilidade de incrementar a concentração de vitamina E através da injeção intra-articular do PPA, conforme demonstrada neste estudo, contorna os obstáculos mencionados, levando a aumento das concentrações locais do antioxidante diretamente em seu sítio de ação, onde elas se encontram, provavelmente, reduzidas. A injeção intra-articular é o método de escolha para administração de agentes terapêuticos com ação local. Ela oferece vantagens sobre a administração sistêmica para moléculas com modo direto de ação. Adicionalmente, este meio de administração aumenta a biodisponibilidade, reduz a exposição sistêmica, e a ligação à moléculas presentes na circulação, além de reduzir a ocorrência de eventos adversos e não direcionados ao tecidos alvo (EVANS et al., 2013).

A comparação da ocorrência de estresse oxidativo na OA e na OCD através da utilização da concentração de grupos proteína carbonil não foi possível neste estudo, uma vez que não observou-se diferença significativa entre as concentrações nas duas afecções. Isto não significa que o estresse oxidativo não tenha ocorrido no curso das enfermidades, mas apenas que o fez em extensão equiparável na OA e na OCD.

Também não foi possível, neste estudo, detectar a ocorrência de dano oxidativo às proteínas através da elevação das concentrações de grupos carbonil, em função do ato cirúrgico, nem sua redução, em função do tratamento com PPA, conforme esperado. Em relação à ocorrência de dano oxidativo no pós-operatório, é importante lembrar que não só as proteínas são alvo de ataque das EROs, mas que também outras moléculas não pesquisadas neste estudo sofrem a ação degradadora destas espécies reativas. A ausência de evidência de dano oxidativo às proteínas no LS após o ato cirúrgico não significa que o desequilíbrio redox não tenha ocorrido. Ele pode ter sido reparado pelos vários mecanismos de defesa antioxidante intra-articulares, antes que a injúria oxidativa tivesse se concretizado sobre as proteínas. Murphy et al. (2011) destacam a impropriedade de inferir sobre a produção de EROs *in vivo* através da utilização de biomarcadores de dano oxidativo, como é o caso dos grupos carbonil. Estes autores lembram que a relação entre o acúmulo de um marcador de dano oxidativo e a produção de uma particular ERO é indireta, dado que alterações nos processos de remoção podem alterar dramaticamente o nível do marcador, sem que tenha ocorrido qualquer alteração na geração destas espécies.

No líquido articular de equinos acometidos por OA e OCD, Dimock, Siciliano e McIlwraith (2000) encontraram valores elevados de proteína carbonil, em comparação com aqueles encontrados no LS de pacientes hígidos. Os autores utilizaram teste semelhante ao empregado no presente estudo, demonstrando ser este um método viável para verificar a ocorrência de dano oxidativo à proteínas no LS equino. Apesar disto é necessário ressaltar que o teste para dosagem das concentrações de proteína carbonil no LS revelou-se bastante trabalhoso e sujeito à falhas. Ele constitui-se de um protocolo de lavagem, com sucessivas centrifugações, diluições e descartes de sobrenadante antes da leitura, podendo implicar em perda de conteúdo das amostras durante este processo. Estas dificuldades técnicas também foram reportadas por outros autores (REZNICK; PACKER, 1994; LYRAS et al., 1996) e podem ter ocasionado variabilidade nas leituras, interferindo nos resultados. De fato, houve elevação da concentração de grupos proteína carbonil após o tratamento com PPA nas articulações acometidas por OA, contrariamente ao esperado, caso o efeito antioxidante deste hemoderivado tivesse resguardado as proteínas da ação das EROs.

Adicionalmente, o teste não é confiável para a quantificação do teor de proteína carbonil em amostras que contenham cromóforos que absorvam a um comprimento de onda de 370 nm, como a hemoglobina, por exemplo (DALLE-DONNE et al., 2003). Conforme mencionado anteriormente, as amostras coletadas no momento 0 horas não apresentaram

contaminação macroscopicamente detectável com sangue, enquanto todas as amostras de LS coletadas 48 horas após o ato cirúrgico apresentavam algum grau de contaminação com sangue. Este fato pode ter interferido nas leituras; a interferência foi reduzida após a centrifugação das amostras, mas, certamente, não por completo.

Ainda em relação ao aumento inesperado da proteína carbonil após o tratamento com PPA, significativo apenas para os portadores de OA, Dukan et al. (2000) ressaltam que a carbonilação, enquanto modificação irreversível, pode servir como um identificador de proteínas estruturalmente danificadas ou modificadas, que não devam ser reparadas e que se destinam à eliminação. Este fenômeno de marcação de proteínas inviáveis pode ter ocorrido em relação às proteínas presentes no PPA, caso elas tenham sido afetadas durante o processamento para obtenção do hemoderivado. Proteínas modificadas tornam-se mais susceptíveis à oxidação e este processo não está vinculado à geração ou a disponibilidade de EROs, mas sim às concentrações de proteínas aberrantes em uma amostra. Para verificar indiretamente a ocorrência de tais modificações nas proteínas do PPA, o teste de proteína carbonil deveria ser realizado no plasma não processado e no plasma processado, para a comparação de valores.

Villasante et al. (2010) também não foram capazes de demonstrar elevação da concentração de grupos proteína carbonil no LS de equinos portadores de OA crônica, onde verificaram apenas uma tendência a valores superiores, em comparação com os de controles saudáveis. Apesar da diferença não significativa entre os grupos, estes autores consideraram o aumento observado como indicador do envolvimento de proteínas, enquanto moléculas alvo do dano oxidativo na OA. O aumento não significativo da concentração de grupos proteína carbonil também foi observado no presente estudo.

Em resumo, a análise do equilíbrio redox realizada revelou a ativação do sistema de defesa antioxidante enzimático no LS de articulações acometidas por OA e OC submetidas à procedimento artroscópico, 48 horas após a realização do ato cirúrgico, em resposta ao estresse oxidativo desencadeado pelo mesmo. À comparação do estado redox nas duas enfermidades, o LS das articulações acometidas por OA apresentou maiores concentrações de catalase e vitamina E, refletindo maior potencial de defesa contra agressões das EROs a seus componentes, e caracterizando a maior intensidade da resposta dos tecidos articulares incitada pelo estresse oxidativo nesta enfermidade. Assim, comparativamente às articulações acometidas por OA, as articulações afetadas pela OC encontram-se mais vulneráveis aos efeitos do estresse oxidativo, e seriam mais beneficiadas por intervenções que auxiliassem no

estabelecimento do equilíbrio redox. As diferenças não significativas entre o perfil oxidativo/antioxidante do LS nas duas afecções articulares em relação a outros parâmetros devem-se, provavelmente, à existência de dano articular em ambas no momento de avaliação inicial, devido à cronicidade das lesões.

O estudo revelou, ainda, em relação ao equilíbrio redox, a propriedade do PPA de fomentar sistemas não enzimáticos de defesa antioxidante do LS, através do incremento das concentrações de vitamina E nas articulações tratadas.

Em relação à análise física do LS, a viscosidade não diferiu entre os portadores de OA e OCD, não servindo como um parâmetro auxiliar na caracterização das enfermidades articulares, e também não sofreu alterações em função do ato cirúrgico. Já em relação à avaliação dos efeitos do tratamento com PPA, ele ocasionou piora dos escores para viscosidade, tanto no LS das articulações acometidas por OA, como no das articulações acometidas por OCD.

A estimativa da viscosidade do LS foi descrita como estando diretamente relacionada à concentração e ao grau de polimerização do AH (PERSSON, 1971). A redução da viscosidade do LS acompanha processos inflamatórios articulares que resultam em diluição do LS, ou em quebra de suas moléculas pela ação enzimática (RAGAN, 1946; STEEL, 2008) ou de EROs (GREENWALD; MOY, 1980). O efeito de diluição das amostras ocorreu no presente estudo apenas no grupo POA, conforme demonstrado pelas dosagens de ureia realizadas no LS. Contudo, este efeito não exclui a possibilidade de adicional degradação do AH por ação enzimática ou de EROs. No grupo POC a diminuição da viscosidade também se verificou, sem concomitante efeito de diluição do LS. Desta forma, observamos que a administração de PPA resultou em redução da viscosidade do LS, tanto nas articulações afetadas por OA como nas afetadas por OCD.

Em articulações híginas de equinos o PPA não afetou negativamente a viscosidade, nem a concentração de AH, em particular. No entanto, induziu a uma resposta inflamatória leve e transitória, observada na análise de outros parâmetros do LS, e extinta 48 horas após sua administração (MOREIRA et al., 2014)³⁵. Esta resposta, caracterizada como branda e efêmera em articulações híginas, pode ter adquirido uma dimensão diferente em articulações já comprometidas pela OA e pela OCD. Somada ao dano resultante da enfermidade articular

³⁵ MOREIRA, J. J.; MORAES, A. P. L.; BROSSI, P. M.; MACHADO, T. S. L.; MICHELACCI, Y. M.; MASSOCO, C. O.; BACCARIN, R. Y. A. **Autologous processed plasma**: cytokine profile and effects upon injection in healthy equine joints. (Aceito para publicação em 2014). Pré-print.

subjacente e ao da manipulação cirúrgica, a resposta inflamatória observada após o emprego intra-articular do PPA, provavelmente gerou repercussões sobre a viscosidade do líquido articular.

A presença de leucócitos polimorfonucleares também está implicada na redução da viscosidade do LS, na medida em que estas células produzem EROs capazes de degradar seus componentes. A diminuição da viscosidade é comumente observada em estados inflamatórios, onde o acúmulo destas células é verificado (GREENWALD; MOY, 1980). No entanto, o aumento do número de células nucleadas totais no LS foi verificado no período pós-operatório em todos os grupos, e apenas os tratados com PPA apresentaram esta redução na viscosidade. Esta observação reforça a associação da redução da viscosidade do LS aos efeitos inflamatórios do PPA.

É necessário lembrar que o teste de viscosidade tal qual realizado neste estudo, é um método de avaliação subjetivo das propriedades e dos componentes do LS. Ele é capaz de detectar apenas alterações grosseiras, não sendo indicado para a avaliação extensiva das propriedades reológicas do LS (REJNÖ, 1975) e não deve ser considerado como uma estimativa direta, quantitativa ou qualitativa, do conteúdo de AH no LS (TROTTER; MCILWRAITH, 1996).

O teste do precipitado de mucina, que também está associado ao conteúdo de AH no LS, ainda que precariamente, não evidenciou efeitos deletérios do PPA, nas articulações acometidas OCD. A qualidade do precipitado de mucina no LS das articulações acometidas por OCD também não foi modificada pelo ato cirúrgico. Nas articulações afetadas por OA, tanto o ato cirúrgico como o tratamento com PPA resultaram em piora na qualidade do precipitado de mucina formado. A comparação dos resultados do LS obtido 48 horas após a artroscopia dos grupos COA e POA para qualidade do precipitado de mucina revelou deterioração equiparável, não associando à administração de PPA efeito particularmente deletério sobre o resultado deste teste. As articulações afetadas por OA mostraram-se, assim, mais vulneráveis frente aos insultos inflamatórios provenientes da manipulação cirúrgica, pela avaliação da qualidade do precipitado de mucina. Contudo, os resultados deste teste devem ser interpretados com cautela, frente a questões relevantes em torno de sua utilidade e especificidade.

A presença da mucina está historicamente associada à viscosidade desde que se verificou que após a precipitação ácida, a viscosidade do LS assemelhava-se à da água e de

que sua reprecipitação com solução de carbonato de cálcio resultava na obtenção de mucina pura. Corroborando com esta observação, a comparação entre viscosidade e conteúdo de mucina no LS de várias espécies animais sugeria que a viscosidade estava relacionada ao grau de polimerização da mucina, bem como à sua concentração (ROPES et al., 1939; ROPES et al., 1940). Desta forma, estabeleceu-se a estreita associação entre a qualidade do precipitado de mucina e a viscosidade do LS. Até a realização do estudo de Meyer et al. (1939), o componente polissacarídeo associado à mucina presente no LS era desconhecido. Estes autores foram responsáveis pela caracterização deste polissacarídeo como ácido hialurônico e atribuíram a ele a viscosidade característica do LS. Ragan (1946) foi um dos primeiros a apontar que o coágulo formado pela precipitação ácida do LS continha não somente a fração proteica (mucina), mas também o polissacarídeo AH, e que alterações no conteúdo de proteína do LS levariam a erros na estimativa da concentração de AH.

Van Pelt (1962) propôs a associação da qualidade do precipitado de mucina formado pela precipitação ácida à concentração e ao grau de polimerização do AH. No entanto, conforme mencionado o resultado deste teste está sujeito às variações das concentrações de proteína no líquido sinovial, sem refletir fidedignamente as concentrações de AH presentes (ROWLEY; ANTONAS; HILBERT, 1982). A avaliação da qualidade do precipitado de mucina pode ser caracterizada, então, como uma medida indireta e imprecisa da concentração da molécula de AH e de seu grau de polimerização no LS, indicando a necessidade de examinar-se com rigor sua utilidade para a caracterização das enfermidades articulares. A recomendação da exclusão deste teste foi feita com base em baixos valores de especificidade e baixos valores preditivos positivos, na avaliação de LS de pacientes com artrite reumatoide (SIBLEY; HARTH; BURNS, 1983). Em equinos, a correlação entre a qualidade do precipitado de mucina e o grau de inflamação articular mostrou-se fraca, e a formação de coágulos de baixa qualidade foi verificada na presença de quadros inflamatórios articulares brandos (WAGNER; MCILWRAITH; MARTIN, 1982). Tendo em vista estas observações, é oportuno o questionamento sobre a utilidade deste teste na avaliação de rotina das características físicas do líquido sinovial.

A contagem de células nucleadas totais aumentou em todas as articulações, independentemente da afecção e da administração de PPA, nas 48 horas seguintes à realização do ato cirúrgico. O mesmo achado foi reportado por Rossetti et al. (2012), que verificaram contagem total de células nucleadas elevada 48 horas após a realização de artroscopia em equinos hígidos. O aumento da celularidade, especialmente de fagócitos polimorfonucleares,

está diretamente relacionado à maior probabilidade de ocorrência de estresse oxidativo e de liberação de citocinas e MMPs, potencialmente degradadoras de MEC (LAURINDO et al., 1997; SUNDMAN et al., 2011; ROSSETTI et al., 2012).

Outros estudos relatam o aumento da celularidade no LS, após a realização de procedimentos articulares. Aumentos significativos na contagem de leucócitos totais foram observados após a lavagem articular em bezerros saudáveis, 24 horas após o procedimento, persistindo por 48 horas (FRANCOZ; DESROCHERS; LATOUCHE, 2007) e em articulações híginas de equinos, 24 horas após a indução experimental de hemartrose (JUDY et al., 2005). O aumento na contagem de células nucleadas totais após a artroscopia não foi observado por Martins (2010), em articulações submetidas a reparo de defeitos osteocondrais, mas este autor realizou a primeira contagem de células totais apenas no sétimo dia após a artroscopia, em contraste com a coleta mais precoce, realizada após 48 horas, neste estudo. Kawcak et al. (1997) também verificaram aumento nas contagens totais de células nucleadas após a artroscopia no carpo de equinos; contudo, realizaram esta análise no LS 13 dias pós a realização do procedimento cirúrgico.

A comparação das contagens celulares no LS nas afecções articulares estudadas demonstrou serem estas contagens mais elevadas na OA, caracterizando-a como uma enfermidade de natureza mais inflamatória que a OCD. Preconiza-se que as contagens celulares totais e diferenciais sejam capazes de auxiliar na distinção entre afecções articulares inflamatórias e não inflamatórias, mas existem poucos resultados publicados que respaldem estas afirmações, exceto em casos de artrites severas, como a artrite séptica ou a artrite reumatoide (SWAN; AMER; DIEPPE, 2002). Alguns trabalhos sugerem que um grau aceitável de diferenciação possa ser alcançado caso um mesmo laboratório processe um número expressivo de amostras, utilizando técnica padronizada (SCHUMACHER et al., 1986; SHMERLING, 1994). Nos equinos, as sinovites idiopáticas e aquelas associadas à OC apresentam contagens totais de células inferiores a 1000 células por microlitro e na OA, dependendo do grau de sinovite existente, as contagens podem variar, mas são geralmente inferiores a 5000 células por microlitro (TROTTER; MCILWRAITH, 1996). As médias encontradas neste estudo para OA e OCD foram de 192,28 e 95,69 células/microlitro, respectivamente, valores bem inferiores aos descritos na literatura para as afecções articulares.

Buscando caracterizar eventos relacionados ao metabolismo da MEC e à homeostase articular, foram realizadas dosagens de dois GAGs, o CS e o AH, no LS. A importância destes GAGs para o perfeito funcionamento articular justifica e reveste de especial significado sua

identificação e quantificação. Para este fim é importante a utilização de métodos apropriados, e o método aqui empregado mostrou ser simples, confiável e superior a outros testes comumente utilizados, como o do azul de dimetilmetileno (DMMB) e o de detecção de epítomos de agregam, entre outros (GLANT et al., 1986; SHARIF et al., 1996; FRISBIE et al., 1999; DE LIMA; BACCARIN; MICHELACCI, 2007; MACHADO et al., 2012).

O significativo aumento nas concentrações de CS nas 48 horas seguintes à realização do ato cirúrgico evidencia a repercussão do procedimento sobre os eventos de síntese e catabolismo da matriz, tanto nos equinos acometidos por OA como naqueles acometidos por OCD. Evidências de degradação da MEC no LS foram reportadas tanto na OA, como na OCD, a despeito do curso e da severidade da enfermidade articular (PETERSSON et al., 1988a,b; ALWAN et al., 1991b; PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; FRISBIE et al., 1999; MCILWRAITH et al., 2005; MACHADO et al., 2012; BACCARIN et al., 2014). Desta forma, soma-se ao conjunto de agressões já incidentes sobre a MEC nestas afecções, o insulto inerente ao ato cirúrgico (KAWKAC et al., 1997; ROSSETTI et al., 2012). Sob esta perspectiva, além de auxiliar na caracterização do impacto do procedimento cirúrgico no pós-operatório imediato, o aumento da concentração de CS verificado sugere a oportunidade de adoção de medidas terapêuticas e preventivas nesta fase, com a finalidade de minimizá-lo. Tais medidas viriam proporcionar melhores condições de reparação e cicatrização das lesões pré-existent, restaurando com maior celeridade a homeostase articular.

O estresse oxidativo está implicado na instalação e progressão da destruição da matriz cartilágnea, tanto na OA (DEL CARLO; LOESER, 2003; HENROTIN; BRUCKNER; PUJOL, 2003; HENROTIN; KURZ; AIGNER, 2005; AFONSO et al., 2007; ZISKOVEN et al., 2011) como na OCD (DIMOCK; SICILIANO; MCILWRAITH, 2000; DAIX et al., 2007; MORITA et al., 2007). A propriedade do PPA de incrementar o sistema de defesa antioxidante no LS, tal qual verificada, reveste-se de especial significado na contraposição aos efeitos do estresse oxidativo que ocorre no período pós-operatório (ROSSETTI et al., 2012). Contudo, o tratamento das articulações acometidas por OA e OCD com PPA não resultou em alteração das concentrações de CS, nas 48 seguintes a sua administração. De forma similar, (MOREIRA et al., 2014)³⁶ não detectaram efeito significativo da administração intra-articular de PPA sobre as concentrações de CS no líquido articular de cavalos hígidos, nas 48 horas

³⁶ MOREIRA, J. J.; MORAES, A. P. L.; BROSSI, P. M.; MACHADO, T. S. L.; MICHELACCI, Y. M.; MASSOCO, C. O.; BACCARIN, R. Y. A. **Autologous processed plasma**: cytokine profile and effects upon injection in healthy equine joints. (Aceito para publicação em 2014). Pré-print.

seguintes à aplicação. Contudo, a avaliação dos efeitos de aplicações semanais do PPA revelou a diminuição das concentrações de CS, durante um período de 4 semanas de observação, sugerindo efeito benéfico do hemoderivado sobre a MEC, a longo prazo. Este efeito necessita ser confirmado em articulações acometidas pela OA e pela OCD. Observando o efeito de outro hemoderivado, o SCA, sobre o metabolismo dos GAGs, Rutgers et al. (2010) também não observaram diferenças, *in vitro*, em explantes de cartilagem humana acometida por OA, durante o período de observação de 12 dias. No entanto, além da diferença de composição entre o PPA e o SCA, os autores aplicaram metodologia diferente da preconizada para a obtenção deste último, dificultando uma possível comparação dos resultados.

Quanto à caracterização das enfermidades através da comparação das concentrações de CS no LS, foi possível inferir que a OCD está associada a maior evidência de degradação de MEC do que a OA. Apesar da clássica associação da OA com a destruição progressiva da cartilagem articular, foram as articulações afetadas pela OCD as que apresentaram maiores evidências de processos de degradação, neste estudo. Anteriormente, Machado et al. (2012) haviam verificado que o LS de articulações afetadas pela OCD, assintomáticas ou não, apresentava concentrações significativamente elevadas de CS, em comparação com as encontradas em articulações saudáveis. Concentrações elevadas de CS também foram reportadas por Alwan et al. (1991b) no LS de equinos afetados por osteocondrite, quando comparadas às aquelas de articulações normais. Estes autores também verificaram concentrações aumentadas de CS no LS de pacientes afetados pela OA, mas a comparação das concentrações de CS na OC e na OA não foi possível, em virtude do reduzido número de articulações afetadas por OC no referido trabalho.

A degradação da matriz nas articulações acometidas por OCD parece refletir, na vida adulta, as repercussões das lesões ocorridas no período fetal ou pós-natal e que, provavelmente, mantém-se ativas no papel de desafiar a homeostase articular. Apesar da instalação precoce das lesões decorrentes de falhas no processo de ossificação endocondral (YTREHUS et al., 2007), a verificação de indícios de degradação de matriz ainda presentes após a conclusão deste processo sugere a ineficiência, ao menos parcial, dos mecanismos de restauração do equilíbrio entre os eventos de síntese e destruição neste sítio. O período que transcorre entre a instalação da lesão e a constatação da maturidade esquelética, por si só, parece não ser suficiente para que este equilíbrio seja restaurado, na ausência de medidas terapêuticas auxiliares.

A demonstração de que a articulação acometida pela OCD, mesmo que assintomática, não apresenta metabolismo de CS normal, quando comparado ao metabolismo articular de indivíduos sãos (MACHADO et al., 2012), e que apresenta metabolismo de CS mais comprometido do que o de articulações acometidas por OA, como verificado no atual estudo, confirma o caráter destrutivo da OCD, em relação aos componentes estruturais da MEC. Estes achados sugerem que os portadores de OCD devam ser abordados de forma mais cautelosa quando da identificação das lesões, e que há subsídios para recomendação de intervenção terapêutica precoce nestes equinos. Esta abordagem incisiva é mais frequente no paciente portador de OA, pelo reconhecimento do impacto desta afecção sobre o desempenho atlético e da natureza progressiva de seu curso (FULLER et al., 2001). A manifestação mais tardia de sintomas e a ocorrência de pacientes assintomáticos associa a OCD, erroneamente, a uma afecção articular de curso benigno, retardando sua correta abordagem, quer seja através de condutas conservativas ou de condutas cirúrgicas (MCILWRAITH, 2013).

Curiosamente, o aumento das concentrações de CS em equinos jovens acometidos por OC não é reportado com frequência (HOOGEN et al., 1999; LAVERTY et al., 2000; BILLINGHURST et al., 2004; DE GRAUW et al., 2011b). Através de diferentes metodologias, estudos demonstram a diminuição das concentrações de CS no LS de equinos jovens acometidos por OC. Lavery et al. (2000) propõem que este conteúdo reduzido de CS no LS de equinos jovens reflita uma perturbação na síntese de agregam. A comparação dos resultados nas diferentes faixas etárias indica que os eventos de degradação de matriz sejam insidiosos a princípio, e perceptíveis apenas mais tardiamente no curso da OC, como verificado por Machado et al. (2012) e também neste estudo.

Em relação ao AH, o tratamento com PPA resultou em redução de sua concentração no LS das articulações acometidas por OCD e não apresentou efeito apreciável no LS das articulações afetadas por OA, nas 48 seguintes a sua utilização. A diminuição da concentração de AH no LS dos pacientes portadores de OCD acompanhou a redução da viscosidade observada nesta enfermidade, demonstrando a correlação existente entre a viscosidade e a concentração de AH nas amostras de LS (MCNEIL et al., 1985; SAARI; KONTTINEN, 1989). À semelhança do ocorrido em relação à viscosidade, a redução no conteúdo de AH resultou, provavelmente, da somatória dos efeitos inflamatórios transitórios do PPA sobre o

LS (MOREIRA et al., 2014)³⁷, do processo inflamatório (KAWCAK et al., 1997) e da geração de EROs, resultantes da artroscopia (ROSSETTI et al., 2012), uma vez que em articulações saudáveis, o PPA não demonstrou efeito considerável sobre as concentrações de AH, particularmente (MOREIRA et al., 2014)³⁸. Este efeito não é desejável, mesmo que em curto prazo, dado que concentrações diminuídas de AH, ou o AH de baixo peso molecular, prejudicam a nutrição e a lubrificação das superfícies articulares (ANTONACCI et al., 2012).

As EROs provavelmente participaram deste fenômeno, uma vez que degradam componentes do tecido conjuntivo, dentre eles o AH, causando despolimerização de suas moléculas (MC NEIL et al., 1985, MYINT et al., 1987; SAARI, 1991), alterando seu peso molecular e a viscosidade do LS (GREEWALD; MOY, 1980; SOLTÉS et al., 2006).

O fato das articulações acometidas por OA não terem apresentado redução das concentrações de AH após o tratamento com o PPA, apesar da redução de viscosidade, pode dever-se ao fato das concentrações de AH já terem se apresentarem reduzidas, quando comparadas às das articulações acometidas por OCD no momento 0 horas. Assim sendo, o leve efeito inflamatório do PPA pode não ter sido de magnitude suficiente para resultar em posterior dano às moléculas de AH no grupo OA, nem em diferenças significativas na comparação entre os diferentes momentos deste grupo.

O achado de concentrações menores de AH no líquido articular das articulações controles do grupo OA, quando comparadas às do grupo OC não é surpreendente. Nas articulações equinas afetadas pela OA, a diminuição da concentração de AH no LS tem sido reportada frequentemente (HILBERT; ROWLEY; ANTONAS, 1984; TULAMO, 1996). Em poucos estudos não foi observada diferença na comparação entre a concentração deste GAG no LS de cavalos hígidos e de cavalos afetados (TULAMO et al., 1994; TAYLOR et al., 2006). A verificação de concentrações reduzidas de AH nos portadores de OA, no presente estudo, está em consonância não somente com os achados da literatura, mas também com a caracterização mais inflamatória da OA em relação a OC, fornecida pelas análises comparativas das contagens celulares, de PGE₂ e proteína total no LS nas duas enfermidades.

Existem poucos dados na literatura relativos às concentrações de AH no LS de articulações acometidas por OCD. Neste estudo, as concentrações apresentaram-se

^{37,38} MOREIRA, J. J.; MORAES, A. P. L.; BROSSI, P. M.; MACHADO, T. S. L.; MICHELACCI, Y.M.; MASSOCO, C. O.; BACCARIN, R. Y. A. **Autologous processed plasma**: cytokine profile and effects upon injection in healthy equine joints. (Aceito para publicação em 2014). Pré-print.

significativamente maiores no LS de articulações acometidas por OCD, quando comparadas com as concentrações verificadas nas articulações com OA. Machado et al. (2012) encontraram concentrações aumentadas de AH no LS de equinos sintomáticos acometidos por OCD quando comparadas às de cavalos hígidos, e atribuíram este achado ao baixo peso molecular do AH encontrado neste grupo de pacientes. O baixo peso molecular pode estar associado à ação de hialuronidases ou à síntese de cadeias de AH de menor peso molecular. No entanto, existem evidências, *in vitro*, de que a expressão de sintases responsáveis pela síntese de cadeias de alto peso molecular do AH sejam estimuladas pela exposição ao CS e à IL-1 β e que, simultaneamente, o CS reduz a transcrição da sintase responsável pela produção de AH de cadeia curta (DAVID- RAOUDI et al., 2007). Se o mesmo ocorre *in vivo*, é pouco provável que haja perturbação nos processos de síntese do AH de alto peso molecular e os mecanismos inflamatórios de degradação passam a estar mais diretamente implicados na despolimerização das cadeias desta molécula. Asari et al. (1994), observaram resultados consoantes com estas observações, ao analisarem o conteúdo total de AH no LS de pacientes humanos com trauma articular agudo. Nestes indivíduos, foi possível observar uma correlação entre a produção de quantidades em excesso de AH, associadas à destruição da cartilagem articular, e concentrações elevadas de CS no LS. Os resultados reportados por estes autores são confirmados no presente estudo, onde maiores concentrações de CS e AH foram encontradas em associação, quando da análise comparativa do LS de articulações afetadas pela OC em relação à OA.

As concentrações aumentadas de AH no LS das articulações acometidas por OCD implicam, ainda, em provável envolvimento da membrana sinovial na evolução desta enfermidade. Apesar de ser encontrado na matriz cartilágnea, a principal fonte do AH são os sinoviócitos do tipo B da membrana sinovial (CARON, 2003) e o aumento da concentração deste GAG sugere sua participação na patogenia desta afecção articular. Na membrana sinovial de equinos portadores de OCD, foi demonstrado o aumento de vilos sinoviais e da população de sinoviócitos tipo A e B, de maneira diretamente proporcional ao grau de inflamação articular (MACHADO et al., 2012). A membrana sinovial é um dos componentes mais reativos da articulação e sua participação pode desencadear e perpetuar o dano à matriz cartilágnea e à ossatura subcondral (KRASNOKUTSKI et al., 2011; BERENBAUM, 2013).

Contrariamente a estes achados, Carmona, López e Prades (2009) encontraram concentrações diminuídas de AH nas articulações tibiotársicas afetadas pela OC em cavalos jovens. No entanto, dada a alta incidência de efusão articular existente na população estudada,

o efeito de diluição deste GAG deveria ter sido considerado, para uma avaliação mais fidedigna de sua concentração no LS.

A caracterização inflamatória da OA e da OCD, bem como a da resposta ao tratamento com PPA, foi feita também através das dosagens de PGE_2 e de proteína total no LS dos indivíduos estudados. As concentrações de PGE_2 e de proteína total foram maiores no grupo OA, quando comparadas às do grupo OCD, contribuindo para a definição de um perfil inflamatório da OA, conforme proposto por Berenbaum (2013).

Em relação à PGE_2 , um dos fatores que poderia ter dificultado a verificação de diferenças significativas entre a OA e a OCD é a alta variabilidade nas concentrações deste biomarcador observada nas afecções articulares, conforme descrito por Bertone, Palmer e Jones (2001). Corroborando para esta informação, May et al. (1994) verificaram baixas concentrações de PGE_2 em articulações afetadas pela OCD, enquanto de Grauw et al. (2006) verificaram incremento na concentração de PGE_2 na OCD. Isto não se verificou neste estudo, e as concentrações de PGE_2 evidenciaram o caráter inflamatório da OA. No entanto, apesar da PGE_2 ser considerada um ótimo biomarcador indireto de inflamação articular, suas concentrações não variaram entre os momentos pré e pós-operatório. Também não houve variação nas concentrações de PGE_2 em função do tratamento com PPA. Murakami et al. (1998) observaram a falta de correlação entre a severidade das lesões articulares degenerativas em articulações temporomandibulares e de suas manifestações dolorosas com as concentrações de PGE_2 no LS. O emprego de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) no período pós-operatório pode ter interferido com os resultados, conforme discutiremos a seguir. Já Kawcak et al. (1997), Rosseland et al. (2007) e Rossetti et al. (2012) demonstraram que as concentrações de PGE_2 aumentam no líquido articular após artroscopias, em humanos e equinos, respectivamente.

Um aumento da concentração de proteína no LS no período pós-operatório não é surpreendente, e já foi descrito após cirurgia articular em equinos (JONES; BARBER; DOIGE, 1993; KAWCAK et al., 1997; ROSSETTI et al., 2012). No presente estudo ele ocorreu exclusivamente no grupo COC, e provavelmente não foi detectado no grupo COA, em função das concentrações já mais elevadas de proteína no LS nesta enfermidade, no momento 0 horas.

O tratamento com PPA aumentou a concentração de proteína no LS nas duas enfermidades, mas de maneira significativa apenas na OA. A injeção de PPA em articulações

de equinos sadios causa um aumento transitório da concentração de proteína total no LS, justificado pela adição do significativo conteúdo de proteína presente no hemoderivado (média de 6 g/dl), conforme descrito por Moreira et al. (2014)³⁹, às 3 e às 6 horas seguintes a sua administração. Quando o PPA é administrado semanalmente e seus efeitos sobre articulações livres de afecções são observados a longo prazo, contudo, as concentrações de proteína apresentam diminuição (MOREIRA et al., 2014)⁴⁰. Para a averiguação dos efeitos do PPA na concentração de proteína total do LS de articulações acometidas por OA e OCD, a longo prazo, novos estudos são necessários.

Uma vez que verificamos a concentração de várias moléculas no LS nos momentos pré e pós-operatório, antes e após o tratamento com o PPA, a concentração de ureia foi determinada no LS, para servir como fator de correção, no caso de eventual diluição das amostras, devida a variação do volume de LS (GOUGH; MUNROE; MAYHEW, 2002). O aumento significativo das concentrações de ureia no LS no grupo POC foi um achado inesperado no presente estudo. Em articulações sadias, a administração intra-articular de PPA não interferiu com a concentração de ureia no LS, indicando não estar, por si só, associada a variações do volume articular (MOREIRA et al., 2014)⁴¹. O aumento de valores de ureia no LS, tal qual verificado no presente estudo, não foi previamente reportado na literatura. Ele parece indicar que as articulações acometidas por OCD e tratadas com PPA apresentaram uma redução na efusão sinovial, quando comparadas às articulações não tratadas. Como a efusão articular é um achado bastante frequente associado à OCD (VAN WEEREN, 2006), a administração do PPA pode ter resultado em redução desta efusão, modulando eventos inflamatórios na membrana sinovial, sítio particular de produção do LS. O envolvimento da membrana sinovial na patogenia da OCD foi comentado anteriormente. Alternativamente, a concentração de ureia pode ter estado elevada no próprio hemoderivado utilizado, alterando as concentrações no LS após sua administração. Para confirmar esta hipótese seria necessário realizar dosagens de ureia nas amostras de PPA. Contudo, dada a livre difusão das moléculas de ureia através das membranas biológicas, mesmo na vigência de sinovite e artropatias (KRAUS et al., 2002; KRAUS et al., 2007), seria esperado que concentrações aumentadas de

^{39,40,41} MOREIRA, J. J.; MORAES, A. P. L.; BROSSI, P.M.; MACHADO, T. S. L.; MICHELACCI, Y.M.; MASSOCO, C. O.; BACCARIN, R. Y. A. **Autologous processed plasma: cytokine profile and effects upon injection in healthy equine joints.** (Aceito para publicação em 2014). Pré-print

ureia provenientes do hemoderivado, caso presentes, tivessem se equilibrado com as concentrações plasmáticas, 48 horas após a aplicação do mesmo.

Já as articulações acometidas por OA e tratadas com PPA apresentaram concentrações diminuídas de ureia, indicando diluição do LS, possivelmente pela presença de efusão articular. Estes achados demonstram a importância da dosagem de ureia na comparação de análises de LS coletado em diferentes momentos, e em função de diferentes tratamentos.

O procedimento cirúrgico não causou interferência nas concentrações de ureia no LS dos animais controles acometidos por OA nem por OCD, indicando que não houve diluição do LS associada a ele ou à lavagem articular. A concentração foi equivalente nas articulações afetadas por OA e OC, não evidenciando efeito particular da enfermidade nas concentrações de ureia no líquido articular.

Finalmente, uma consideração importante deve ser feita para a análise de todos os resultados deste estudo. Ela se refere à potencial influência do uso de AINEs, particularmente a fenilbutazona (PBZ) no período pós-operatório. A utilização da PBZ é parte do protocolo adotado pelo Hospital da FMVZ-USP, seguindo a recomendação da maioria dos estudos na espécie equina, para o controle da dor e da inflamação no período pós-operatório (GOODRICH, 2009).

Em relação ao estresse oxidativo, é importante lembrar que os AINEs, inclusive a PBZ, apesar de serem fundamentalmente inibidores da cicloxigenase, também combatem a geração e estimulam a captura de EROs (YOSHIHIKO, 1976; LUNEC et al., 1981; HALLIWELL et al., 1988; UMEKI, 1990; SITUNAYAKE et al., 1991). A geração do radical superóxido, substrato para a ação da SOD é particularmente sensível à ação dos AINES (YOSHIHIKO, 1976; AUER; NG; SEAWRIGHT, 1990b). Minimizando as concentrações de EROS, o emprego da PBZ pode ter preservado ou incrementado as reservas e as defesas antioxidantes, indistintamente, em todos os momentos e grupos deste estudo, não permitindo a completa apreciação do efeito do ato cirúrgico, nem do PPA, sobre os diferentes parâmetros analisados. A inibição da geração de EROS pela PBZ também pode ter interferido com a identificação de marcadores de dano oxidativo, conforme ressaltado por Dimock, Siciliano e McIlwraith (2000). Várias evidências *in vivo*, contudo, não confirmam a interferência dos AINEs na geração do estresse oxidativo. No estudo realizado por Dimock, Siciliano e McIlwraith (2000), o LS também foi coletado de equinos submetidos à artroscopia, e que em sua maioria haviam sido tratados com AINEs no período pré-operatório. Apesar do disto,

os autores foram capazes de detectar marcadores de oxidação proteica, mas comentaram sobre a interferência do tratamento nos resultados obtidos na avaliação do sistema antioxidante total, que se manteve inalterada. Ainda, McAnulty et al. (2007) observaram que as concentrações de grupos proteína carbonil estavam significativamente aumentadas em atletas que faziam uso de AINEs, comparadas às de atletas de corrida que não faziam uso de tais medicamentos. Neste estudo os níveis de antioxidantes totais foram iguais nos indivíduos tratados e naqueles não tratados com AINEs, revelando a necessidade de maiores estudos para comprovar, *in vivo*, o papel destas drogas no estresse oxidativo.

O emprego da PBZ certamente teve alguma influência na indiferença dos resultados de PGE₂, nos momentos pré e pós-operatório, e em função do tratamento com PPA, uma vez que ela inibe o sistema enzimático diretamente responsável pela síntese de prostanóides, tais como a PGE₂ (TOBIN et al., 1986). No LS de equinos, em modelo de OA experimentalmente induzida, o uso de PBZ resultou em redução das concentrações de PGE₂ (OWENS et al., 1996; MORTON et al., 2005). Apesar da possibilidade de interferência nos resultados das concentrações de PGE₂ em função da administração de PBZ, a inclusão de marcadores de inflamação neste estudo visou detectar diferenças entre os valores dos grupos tratados com PPA e os grupos controles, uma vez que ambos receberam tratamento com PBZ.

Da mesma forma como é capaz de influenciar as concentrações de PGE₂, o emprego de PBZ pode reduzir a concentração de proteína total no LS de equinos (OWENS et al., 1996). Este efeito não foi observado neste estudo, e as concentrações de proteína total no LS aumentaram de forma imprevisível durante o experimento.

Apesar da influência da PBZ sobre os parâmetros de inflamação e de estresse oxidativo no líquido articular, é importante notar que seus efeitos não impediram a caracterização do perfil inflamatório da OA, feita através dos incrementos nas contagens celulares e nas concentrações de PGE₂ e proteína total observados, em relação à OCD. Também não impediram a verificação da ativação de enzimas antioxidantes no LS relacionada ao procedimento cirúrgico e, portanto, a ocorrência do estresse oxidativo.

Laurindo et al. (1997) demonstraram que o uso de substâncias antioxidantes reduziram os parâmetros clássicos do processo inflamatório articular, como o aumento da celularidade, a permeabilidade vascular e a produção de eicosanóides. No presente momento, contudo, conclusões definitivas não podem ser apresentadas em relação aos efeitos do PPA sobre os parâmetros inflamatórios em articulações acometidas por OA e OCD, em função do

comportamento errático das concentrações de proteína total no LS nas articulações estudadas e da administração concomitante de PBZ com o PPA, no decorrer deste estudo.

Por outro lado, Weglarz, Drözd e Goss (1990) demonstraram que o emprego de AINEs resultou em redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx no fígado e rins de ratos, prejudicando os sistemas de defesa antioxidante nestes tecidos. A PBZ também é capaz de acelerar o processo de peroxidação lipídica do ácido aracdônico e o dano às proteínas, provocado por uma mistura de peróxido de hidrogênio e mioglobina (EVANS; AKANMU; HALLIWELL, 1994; MIURA; MURAOKA; FUJIMOTO, 2002). Contudo, os efeitos indesejáveis da PBZ demonstrados nestes estudos, sobre componentes lipídicos e proteicos das células, estão associados à administração prolongada da droga, e provavelmente não estão reproduzidos no protocolo de curta duração em que ela foi utilizada neste experimento.

8 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que as defesas antioxidantes estão ativadas no líquido sinovial de equinos portadores de OA ou OCD, assim como estão ativados os mecanismos de degradação da MEC da cartilagem articular, 48 horas após a realização de artroscopia.

Em relação à caracterização comparativa das enfermidades, foi possível demonstrar o perfil mais inflamatório, bem como maior ativação dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos na OA. Por outro lado, a OCD caracterizou-se por maiores evidências de eventos degradadores da MEC cartilágnea e do líquido sinovial.

Os resultados demonstraram, ainda, que o tratamento com PPA imediatamente após artroscopias é capaz de incrementar o sistema de defesa antioxidante nas articulações de equinos portadores de OA ou OCD, 48 horas após sua administração. Contudo, efeitos anti-inflamatórios ou condroprotetores associados à administração do PPA não foram observados.

REFERÊNCIAS

- .FERNANDES, J. C.; MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J. P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. **Biorheology**, v. 39, n. 1-2, p. 237-246, 2002.
- .MARTIN, J. A.; MCCABE, D.; WALTER, M.; BUCKWALTER, J. A.; MCKINLEY, T. O. N-acetylcysteine inhibits post-impact chondrocyte death in osteochondral explants. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 91, n. 8, p. 1890-1897, 2009.
- ABDOLLAHI, M.; LARIJANI, B.; RAHIMI, R.; SALARI, P. Role of oxidative stress in osteoporosis. **Future Medicine**, v. 2, n. 5, p. 787-796, 2005.
- ABRAMOVA, N. E.; DAVIES, K. J.; CRAWFORD, D. R. Polynucleotide degradation during early stage response to oxidative stress is specific to mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 2, p.281-288, 2000.
- ABRAMSON, S. B. Osteoarthritis and nitric oxide. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, p. S15-20, 2008. Supplement, 2.
- ADACHI, S.; ZEISIG, M.; MÖLLER, L. Improvements in the analytical method for 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 2, p. 253-258. 1995.
- ADAMS, S. L.; COHEN, A. J.; LASSOVÁ, L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. 3, p. 635-641, 2007.
- ADIB-CONQUY, M.; CAVAILLON, J. M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. **Thrombosis and Haemostasis**, v.101, n.1, p. 36-47, 2009.
- AFONSO, V.; CHAMPY, R.; MITROVIC, D.; COLLIN, P.; LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint, Bone, Spine: Revue du Rhumatisme**, v. 74, n. 4, p. 324-329, 2007.
- AHMAD, R.; SYLVESTER, J.; AHMAD, M.; ZAFARULLAH, M. Involvement of H-Ras and reactive oxygen species in proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase-13 expression in human articular chondrocytes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.507, n. 2, p. 350-355, 2011.
- AIGNER, T.; FUNDEL, K.; SAAS, J.; GEBHARD, P. M.; HAAG, J.; WEISS, T.; ZIEN, A.; OBERMAYR, F.; ZIMMER, R.; BARTNIK, E. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 11, p. 3533-3544, 2006.
- AIGNER, T.; HEMMEL, M.; NEUREITER, D.; GEBHARD, P. M.; ZEILER, G.; KIRCHNER, T.; MCKENNA, L. Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 6, p. 1304-1312, 2001.

AIGNER, T.; ROSE, J.; MARTIN, J.; BUCKWALTER, J. Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology. **Rejuvenation Research**, v. 7, n. 2, p. 134-145, 2004.

ALAAEDDINE, N.; DI BATTISTA, J.; PELLETIER, J. P.; KIANSA, K.; CLOUTIER, J. M.; MARTEL-PELLETIER, J. Inhibition of tumor necrosis factor α -induced prostaglandin E₂ production by the anti-inflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts. **Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 4, p. 710-718, 1999.

ALCARAZ, M. J.; MEGÍAS, J.; GARCÍA-ARNANDIS, I.; CLÉRIGUES, V.; GUILLÉN, M. I. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 13-21, 2010.

ALTINDAG, O.; EREL, O.; AKSOY, N.; SELEK, S.; CELIK, H.; KARAOGLANOGLU, M. Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. **Rheumatology international**, v. 27, n. 4, p. 339-344, 2007.

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

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

AMES, B. N. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. **Free Radical Research**, v. 7, n. 3-6, p.121-128, 1989.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Mitochondrial decay in aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1271, n. 1, p. 165-170, 1995.

AMSTAD, P.; PESKIN, A.; SHAH, G.; MIRAUULT, M. E.; MORET, R.; ZBINDEN, I.; CERUTTI, P. The balance between copper-zinc superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. **Biochemistry**, v. 30, n. 38, p. 9305-9313, 1991.

ANDERSON, D. D.; CHUBINSKAYA, S.; GUIAK, F.; MARTIN, J. A.; OEGEMA, T. R.; OLSON, S. A.; BUCKWALTER, J. A. Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 6, p. 802-809, 2011.

ANTONACCI, J. M.; SCHMIDT, T. A.; SERVENTI, L. A.; CAI, M. Z.; SHU, Y. L., SCHUMACHER, B. L.; SAH, R. L. Effects of equine joint injury on boundary lubrication of articular cartilage by synovial fluid: role of hyaluronan. **Arthritis and rheumatism**, v.64, n. 9, p. 2917-2926, 2012.

ANTONINI, E.; BRUNORI, M.; GREENWOOD, C.; MALMSTRÖM, B. G. Catalytic mechanism of cytochrome oxidase. **Nature**, v. 228, n. 5275, p. 936-937, 1970.

ARAI, M. Catalase activity of synovial fluid in joint diseases. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v.91, n. 1, p. 35, 1967.

AREND, W. P. The balance between IL-1 and IL-1ra in disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 323-340, 2002.

AREND, W. P.; GABAY, C. Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. **Arthritis Research**, v. 2, n. 4, p. 245-248, 2000.

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

AREND, W. P.; WELGUS, H. G.; THOMPSON, R. C.; EISENBERG, S. P. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 5, p. 1694-1697, 1990.

ARNHEIM, N.; CORTOPASSI, G. Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. **Mutation Research/DNAging**, v. 275, n.3, p.157-167, 1992.

ARRIGO, A. P. Gene expression and the thiol redox state. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n.9, p. 936-944, 1999.

ART, T.; LEKEUX, P. Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. **Livestock Production Science**, v. 92, n. 2, p. 101-111, 2005.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

ARUOMA, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 7, p. 671-683, 1994.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; DIZDAROGLU, M. (. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 22, p. 13024-13028, 1989.

ASADA, S.; FUKUDA, K.; OH, M.; HAMANISHI, C.; TANAKA, S. Effect of hydrogen peroxide on the metabolism of articular chondrocytes. **Inflammation Research**, v. 48, n. 7, p. 399-403, 1999.

ASARI, A.; MIYAUCHI, S.; SEKIGUCHI, T.; MACHIDA, A.; KURIYAMA, S.; MIYAZAKI, K.; NAMIKI, O. Hyaluronan, cartilage destruction and hydrarthrosis in traumatic arthritis. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 2, n. 2, p.79-89, 1994.

ATTUR, M.; AL-MUSSAWIR, H. E.; PATEL, J.; KITAY, A.; DAVE, M.; PALMER, G.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E₂ exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 5082-5088, 2008.

AUER, D. E., NG, J. C., & SEAWRIGHT, A. A. Superoxide production by stimulated equine polymorphonuclear leukocytes-inhibition by anti-inflammatory drugs. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v.13, n.1, p. 59-66, 1990a.

AUER, D. E., NG, J. C.; HRDLICKA, J.; SEAWRIGHT, A. A. The elimination of injected superoxide dismutase from synovial fluid of the horse. **Australian veterinary journal**, v. 66, n. 4, p. 117-119, 1989.

AUER, D. E.; NG, J. C.; SEAWRIGHT, A. S. Free radical oxidation products in plasma and synovial fluid of horses with synovial inflammation. **Australian veterinary journal**, v. 70, n. 2, p. 49-52, 1993.

AUER, D. E.; NG, J. C.; SEAWRIGHT, A. A. Effect of pallosein (superoxide dismutase) and catalase upon oxygen derived free radical induced degradation of equine synovial fluid. **Equine veterinary journal**, v. 22, n. 1, p. 13-17, 1990b.

AUST, S. D. Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. **Bibliotheca nutritio et dieta**, v. 43, 266-277, 1988.

BACCARIN, R. Y.; RASERA, L.; MACHADO, T. S.; MICHELACCI, Y. M. Relevance of synovial fluid chondroitin sulphate as a biomarker to monitor polo pony joints. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 78, n.1, p.50-60, 2014.

BAKER, M. S.; GREEN, S. P.; LOWTHER, D. A. Changes in the viscosity of hyaluronic acid after exposure to a myeloperoxidase-derived oxidant. **Arthritis and rheumatism**, v. 32, n. 4, p. 461-467, 1989.

BALASUBRAMANYAM, M.; ADAIKALAKOTESWARI, A.; SAMEERMAHMOOD, Z.; MOHAN, V. Biomarkers of oxidative stress: methods and measures of oxidative DNA damage (COMET assay) and telomere shortening. **Methods in Molecular Biology**, v. 610, p. 245-261, 2010.

BALAZS, E. A. The Physical Properties of Synovial Fluid and the Special Role of Hyaluronic Acid. In: HELFET, A. (Ed.). **Disorders of the Knee**. Philadelphia: T.B. Lippincott Company, 1974. Cap. 5, p. 63-75.

BALIN, A. K.; FISHER, A. J.; CARTER, D. M. Oxygen modulates growth of human cells at physiologic partial pressures. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 160, n. 1, p. 152-166, 1984.

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

BANDT, M. D.; GROSSIN, M.; DRISS, F.; PINCEMAIL, J.; BABIN-CHEVAYE, C.; PASQUIER, C. Vitamin E uncouples joint destruction and clinical inflammation in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 46, n. 2, p. 522-532, 2002.

BAST, A. A. L. T.; Haenen, G. R.; Doelman, C. J. Oxidants and antioxidants: state of the art. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3, p. S2-S13, 1991.

BASTOW, E. R.; BYERS, S.; GOLUB, S. B.; CLARKIN, C. E.; PITSILLIDES, A. A.; FOSANG, A.J. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, n. 3, p. 395-413, 2008.

BATES, E. J.; LOWTHER, D. A.; HANDLEY, C. J. Oxygen free-radicals mediate an inhibition of proteoglycan synthesis in cultured articular cartilage. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 43, n. 3, p. 462-469, 1984.

- BECCATI, F.; SCALONI, A. Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4478-4493, 2012.
- BEECHER, B. R.; MARTIN, J. A.; PEDERSEN, D. R.; HEINER, A. D.; BUCKWALTER, J. A. Antioxidants block cyclic loading induced chondrocyte death. **The Iowa Orthopaedic Journal**, v. 27, p. 1-8, 2007.
- BELCHER, C.; YAQUB, R.; FAWTHROP, F.; BAYLISS, M.; DOHERTY, M. Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 56, n.5, 299-307, 1997.
- BELLIDO, M.; LUGO, L.; ROMAN-BLAS, J. A.; CASTAÑEDA, S.; CAEIRO, J. R.; DAPIA, S.; CALVO, E.; LARGO, R.; HERRERO-BEAUMONT, G. Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 12, n. 4: R152, 2010.
- BENSASSON, R.; LAND, E. J.; MAUDINAS, B. Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet and electron pulse irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 23, n. 3, p. 189-193, 1976.
- BERENBAUM, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 1, p. 16-21, 2013.
- BERGER, N. A. Oxidant-induced cytotoxicity: a challenge for metabolic modulation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-3, 1991.
- BERTONE, A. L. Joint physiology: responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine Sports Medicine and Surgery**, 1. ed. [S.I.]: Saunders, 2004. Cap 9, p. 152-160.
- BERTONE, A. L.; McILWRAITH, C. W.; POWERS, B. E.; RADIN, M. J. Effect of four antimicrobial lavage solutions on the tarsocrural joint of horses. **Veterinary Surgery**, v.15, n. 4, p. 305-315, 1986.
- BERTONE, A. L.; PALMER, J. L.; JONES, J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. **Veterinary Surgery**, v.30 n.6, p.528-538, 2001.
- BERTRAND, J.; CROMME, C.; UMLAUF, D.; FRANK, S.; PAP, T. Molecular mechanisms of cartilage remodeling in osteoarthritis. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 10, p. 1594-1601, 2010.
- BETTS, W. H.; CLELAND, L. G. Effect of metal chelators and antiinflammatory drugs on the degradation of hyaluronic acid. **Arthritis and Rheumatism**, v. 25, n.12, p. 1469-1476, 1982.
- BIELSKI, B. H.; RICHTER, H. W.; CHAN, P. C. Some properties of the ascorbate free radical. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 30, n. 258, p. 231-237, 1975.
- BIEMOND, P.; SWAAK, A. J.; KOSTER, J. F. Protective factors against oxygen free radicals and hydrogen peroxide in rheumatoid arthritis synovial fluid. **Arthritis and Rheumatism**, v. 27, n. 7, p. 760-765, 1984.

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.

BLAKE, D. R.; HALL, N. D.; TREBY, D. A.; HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against superoxide and hydrogen peroxide in synovial fluid from rheumatoid patients. **Clinical Science**, v. 61, n.4, p. 483-86, 1981.

BLAKE, D. R.; UNSWORTH, J.; OUTHWAITE, J. M.; MORRIS, C. J. MERRY, P.; KIDD, B. L.; BALLARD R. , GRAY L.; LUNEC, J. Hypoxic-reperfusion injury in the inflamed human joint. **The Lancet**, v. 333, n. 8633, p. 289-293, 1989.

BLANCO, F. J.; GENG, Y.; LOTZ, M. Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression. **The Journal of Immunology**, v. 154, n. 8, p. 4018-4026, 1995.

BLANCO, F. J.; GUITIAN, R.; VÁZQUEZ-MARTUL, E.; DE TORO, F. J.; GALDO, F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 2, p. 284-289, 1998.

BLANCO, F. J.; GUITIAN, R.; VÁZQUEZ-MARTUL, E.; DE TORO, F. J.; GALDO, F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: a possible pathway for osteoarthritis pathology. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 2, p. 284-289, 1998a.

BLANEY DAVIDSON, E. N.; VAN DER KRAAN, P. M.; VAN DEN BERG, W. B. TGF- β and osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 6, p. 597-604, 2007.

BOHNDORF, K. Osteochondritis (osteochondrosis) dissecans: a review and new MRI classification. **European Radiology**, v. 8, n. 1, p. 103-112, 1998.

BONDENSON, J.; WAINWRIGHT, S. D.; LAUDER, S.; AMOS, N.; HUGHESS, C. E. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 8, n. 6: R187, 2006.

BOOM, R. V. D., LEST, C. V. D., BULL, S., BRAMA, P. A. J., 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.

BORSICZKY, B.; SZABÓ, Z.; JABERANSARI, M. T.; MACK, P. P.; RÖTH, E. Activated PMNs lead to oxidative stress on chondrocytes: a study of swine knees. **Acta Orthopaedica**, v. 74, n. 2, p. 190-195, 2003.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. **FEBS letters**, v.54, n.3, p. 311-314. 1975.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **The Biochemical Journal**, v.134, p. 707-716, 1973.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **The Biochemical Journal**, v.128, p. 617-630, 1972.

BRAND, C.; SNADDON, J.; BAILEY, M.; CICUTTINI, F. Vitamin E is ineffective for symptomatic relief of knee osteoarthritis: a six month, double blind, randomized, placebo controlled study. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 60, n. 10, p. 946-949, 2001.

BRANDL, A.; HARTMANN, A.; BECHMANN, V.; GRAF, B.; NERLICH, M.; ANGELE, P. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n.7, p.1114-1120, 2011.

BRANDT, K. D.; MYERS, S. L.; BURR, D.; ALBRECHT, M. Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, suchondral bone, and synovium fifty-four months after transaction of the anterior cruciate ligament. **Arthritis and Rheumatism**, V. 347, N. 12, P. 1560-1570, 1991.

BRANDT, K. D.; RADIN, E. L.; DIEPPE, P. A.; VAN DE PUTTE, L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. **Annals of the Rheumatic Disease**, v. 65, n. 10, p. 1261-1264, 2006.

BROSSI, P. M.; BACCARIN, R. Y.; MASSOCO, C. O. Do blood components affect the production of reactive oxygen species (ROS) by equine synovial cells in vitro?. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n. 12, p. 1355-1360, 2012.

BRYAN, N.; AHSWIN, H.; SMART, N.; BAYON, Y.; WOHLERT, S.; HUNT, J. A. Reactive oxygen species (ROS)—a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. **European Cells & Materials**, v. 24, p. 249-265, 2012.

BUCKWALTER, J. A. Sports, joint injury, and posttraumatic osteoarthritis. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 33, n. 10, p. 578-588, 2003.

BUCKWALTER, J. A.; ANDERSON, D. D.; BROWN, T. D.; TOCHIGI, Y.; MARTIN, J. A. The roles of mechanical stresses in the pathogenesis of osteoarthritis: implications for treatment of joint injuries. **Cartilage**, v. 4, n. 4, p. 286-294, 2013.

BUCKWALTER, J. A.; LANE, N. E. Athletics and osteoarthritis. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 25, n. 6, p. 873-881, 1997.

BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. **Instructional course lectures**, v. 47, p. 477-486, 1997a.

BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons-Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions*†. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 79, n. 4, p. 600-11, 1997b.

BURKHARDT, H.; SCHWINGEL, M.; MENNINGER, H.; MACARTNEY, H. W.; TSCHESCHE, H. Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes. **Arthritis and rheumatism**, v. 29, n. 3, p. 379-387, 1986.

BURR, D. B. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, p. S20-30, 2004. Supplement A.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 222-230, 2000.

CAI, J.; JONES, D. P. Superoxide in Apoptosis mitochondrial generation triggered by cytochrome C loss. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.19, p. 11401-11404, 1998.

CANTER, P. H.; WIDER, B.; ERNST, E. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. **Rheumatology**, v. 46, n.8, p.1223-1233, 2007.

CARAMÉS, B.; TANIGUSHI, N.; OTSUKI S, S.; BLANCO, F. J.; LOTZ, M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage and its aging related loss is linked with cell death and osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 3, p. 791-801, 2010.

CARLSON, C. S.; CULLINS, L. D.; MEUTEN, D. J. Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses. Evidence for a defect in cartilage canal blood supply. **Veterinary Pathology**, v. 32, n. 6, p. 641-647, 1995.

CARMONA, J.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. Determinación de marcadores inflamatorios y anabólicos articulares en caballos jóvenes estabulados con osteocondrosis tarsocrural. **Revista MVZ Córdoba**, v.15, n. 1, p.1907-1915, 2010.

CAROLL, M. V.; SIM, R. B. Complement in health and disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 12, p. 965-975, 2011.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 1. ed. St. Louis: Saunders, 2003. cap 63, p. 572-591.

CASTAÑEDA, S.; ROMAN-BLAS, J. A.; LARGO, R.; HERRERO-BEAUMONT, G. Subchondral bone as key target for osteoarthritis treatment. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 3, p. 315-323, 2012.

CATTERALL, J. B.; STABLER, T. V.; FLANNERY, C. R.; KRAUS, V. B. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury. **Arthritis Research and Therapy**, v. 12, n. 6:R229, 2010.

CERCIELLO, S.; BEITZEL, K.; HOWLETT, N.; RUSSELL, R. P.; APOSTOLAKOS, J.; MCCARTHY, M. B.; COTE, M. P.; MAZZOCCA, A. D. The Use of Platelet-Rich Plasma Preparations in the Treatment of Musculoskeletal Injuries in Orthopaedic Sports Medicine. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 23, n. 2, p.69-74, 2013.

CHAN, P. S.; CARON, J. P.; ROSA, G. J. M.; ORTH, M. W. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E₂ in articular cartilage explants. **Osteoarthritis and cartilage**, v.13, n. 5, p. 387-394, 2005.

CHAPPLE, I. L. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, n. 5, p. 287-296, 1997.

- CHEN, J.; DELANNOY, M.; ODWIN, S.; HE, P.; TRUSH, M. A.; YAGER, J. D. Enhanced mitochondrial gene transcript, ATP, bcl-2 protein levels, and altered glutathione distribution in ethinyl estradiol-treated cultured female rat hepatocytes. **Toxicological Sciences**, v. 75, n. 2, p. 271-278, 2003.
- CHENEVIER-GOBEAUX, C.; LEMARECHAL, H.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; POIRAUDEAU, S.; EKINDJIAN, O. G.; BORDERIE, D. Superoxide production and NADPH oxidase expression in human rheumatoid synovial cells: regulation by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α . **Inflammation Research**, v. 55, n.11, p. 483-490, 2006.
- CHEVALIER, X. Intraarticular treatments for osteoarthritis: new perspectives. **Current drug targets**, v. 11, n.5, p. 546-560, 2010.
- CHIARADIA, E.; PEPE, M.; TARTAGLIA, M.; SCOPPETTA, F.; D'AMBROSIO, C.; RENZONE, G.; AVELLINI, L.; MORICONI, F.; GAITI, A.; BERTUGLIA, A.;
- CHOW, C. K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, n. 2, p. 215-232, 1991.
- CHOWDHURY, T. T.; BADER, D. L.; LEE, D. A. Anti-inflammatory effects of IL-4 and dynamic compression in IL-1 β stimulated chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 1, p. 241-247, 2006.
- CIFUENTES, D. J.; ROCHA, L. G.; SILVA, L. A.; BRITO, A. C.; RUEFF-BARROSO, C. R.; PORTO, L. C.; PINHO, R. A. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n.8, p. 1088-1095, 2010.
- CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.
- CLANCY, R. M.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, J.; ABRAMSON, S. B. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 3, p. 1116-1121, 1992.
- CLEGG, P. D.; MOBASHERI, A. Chondrocyte apoptosis, inflammatory mediators and equine osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, v. 166, n.1, p. 3-4, 2003.
- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.
- CRAIG, F. M.; BAYLISS, M. T.; BENTLEY, G.; ARCHER, C. W. A role for hyaluronan in joint development. **Journal of Anatomy**, v. 171, p. 17-23, 1990.
- CRAWFORD, D. R.; LAUZON, R. J.; WANG, Y.; MAZURKIEWICZ, J. E.; SCHOOLS, G. P.; DAVIES, K. J. 16S mitochondrial ribosomal RNA degradation is associated with apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 7, p. 1295-1300, 1997b.
- CRAWFORD, D. R.; ABRAMOVA, N. E.; DAVIES, K. J. Oxidative stress causes a general, calcium-dependent degradation of mitochondrial polynucleotides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 9, p. 1106-1111, 1998.

CRAWFORD, D. R.; WANG, Y.; SCHOOLS, G. P.; KOCHHEISER, J.; DAVIES, K. J. Down-regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n.3, p. 551-559, 1997a.

CRICHTON, R. R.; CHARLOTEAUX-WAUTER, M. Iron transport and storage. **European Journal of Biochemistry**, v. 164, n. 3, p. 485-506, 1987.

CRUZ, A. M.; HURTIG, M. B. Multiple pathways to osteoarthritis and articular fractures: is subchondral bone the culprit? **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 24, n. 1, p. 101-116, 2008.

CURNUTTE, J. T.; BABIOR, B. M. Chronic granulomatous disease. In: HARRIS, H. (Ed.). **Advances in human genetics**. New York: Springer Science+ Business Media, 1987, p. 229-297.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; ESPOSITO, E.; MACARTHUR, H.; MATUSCHAK, G. M.; SALVEMINI, D. A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 1, p. 73-81, 2006.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of immunological methods**, v. 232, n. 1, p. 3-14, 1999.

DAI, L.; CLAXSON, A.; MARKLUND, S. L.; FEAKINS, R.; YOUSAF, N.; CHERNAJOVSKY, Y.; WINYARD, P. G. Amelioration of antigen-induced arthritis in rats by transfer of extracellular superoxide dismutase and catalase genes. **Gene therapy**, v.10, n.7, p. 550-558, 2003.

DAI, S. M.; SHAN, Z. Z.; NAKAMURA, H.; MASUKO-HONGO, K.; KATO, T.; NISHIOKA, K.; YUDOH, K. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: Possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 3, p. 818-831, 2006.

DAIX, M.; ANTYS-BECKER, M.; GATHER, C.; WIGGERS, L.; BISTER, J. L.; WEINBERGER, T.; KIRSCHVINK, N. Matrix metalloproteinase 2 and 9 activities and isoprostane concentration in equine synovial fluid comparison between healthy horses with articular disease. In: EUROPEAN COLLEGE OF VETERINARY SURGEONS, 16, Dublin, Irlanda. **Proceedings...** Dublin: ECVS, 2007, p. 267-269.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1, p. 23-38, 2003.

DANG, P. M.; ELBIM, C.; MARIE, J. C.; CHIANDOTTO, M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; EL-BENNA, J. Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. **FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1504-1506, 2006.

DARABOS, N.; HASPL, M.; MOSER, C.; DARABOS, A.; BARTOLEK, D.; GROENEMEYER, D. Intraarticular application of autologous conditioned serum (ACS)

reduces bone tunnel widening after ACL reconstructive surgery in a randomized controlled trial. **Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy**, v. 19, n.1, p. 36-46, 2011.

DARABOS, N.; HUNDRIC-HASPL, Z.; HASPL, M.; MARKOTIC, A.; DARABOS, A.; MOSER, C. Correlation between synovial fluid and serum IL-1 β levels after ACL surgery—preliminary report. **International orthopaedics**, v. 33, n. 2, p. 413-418, 2009.

DAVICCO, M. J.; FAULCONNIER, Y.; COXAM, V.; DUBROEUCQ, H.; MARTIN-ROSSET, W.; BARLET, J. P. Systemic bone growth factors in light breed mares and their foals. **Archives Internacionales de physiologie, de biochimie et de biophysique**, v. 102, n. 2, p. 115-119, 1994.

DAVID-RAOUDI, M.; DESCHREVEL, B.; LECLERCQ, S.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K.; PUJOL, J. P. Chondroitin sulfate increases hyaluronan production by human synoviocytes through differential regulation of hyaluronan synthases: Role of p38 and Akt. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n.3, p. 760-770, 2009.

DAVIES, C. M.; GUILAK, F.; WEINBERG, J. B.; FERMOR, B. Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 16, n. 5, p. 624-630, 2008.

DAVIES, K. J. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. **IUBMB life**, v. 48, n. 1, p. 41-47, 1999.

DAY, J. S.; DING, M.; VAN DER LINDEN, J. C.; HVID, I.; SUMNER, D. R.; WEINANS, H. A decrease subchondral trabecular bone tissue elastic modulus is associated with pre-arthritic cartilage damage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 19, n. 5, p. 914-918, 2001.

DE GRAUW, J. C. Molecular monitoring of equine joint homeostasis. **Veterinary Quarterly**, v. 31, n. 2, p. 77-86, 2011a.

DE GRAUW, J. C.; BRAMA, P. A.; WIEMER, P.; BROMMER, H.; VAN DE LEST, C. H.; VAN WEEREN, P. R. Cartilage-derived biomarkers and lipid mediators of inflammation in horses with osteochondritis dissecans of the distal intermediate ridge of the tibia. **American journal of veterinary research**, v. 67, n. 7, p. 1156-1162, 2006.

DE GRAUW, J. C.; DONABÉDIAN, M.; VAN DE LEST, C. H. A.; PERONA, G.; ROBERT, C.; LEPAGE, O.; VAN WEEREN, P. R. Assessment of synovial fluid biomarkers in healthy foals and in foals with tarsocrural osteochondrosis. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 3, p. 390-395, 2011 b.

DE LIMA, C. R.; BACCARIN, R. Y.; MICHELACCI, Y. M. Reliability of 1, 9-dimethylmethylene blue tests in comparison to agarose gel electrophoresis for quantification of urinary glycosaminoglycans. **Clinica chimica acta**, v. 378, n. 1, p. 206-215, 2007.

DEL CARLO, M. Jr.; LOESER, R. F. Cell death in osteoarthritis. **Current Rheumatology Reports**, v. 10, n. 1, p. 37-42, 2008.

DEL CARLO, M. Jr.; LOESER, R. F. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 12, p. 3419-3430, 2003.

DEL CARLO, M.; SCHWARTZ, D.; ERICKSON, E. A.; LOESER, R. F. Endogenous production of reactive oxygen species is required for stimulation of human articular chondrocyte matrix metalloproteinase production by fibronectin fragments. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 9, p. 1350-1358, 2007.

DEL CARLO, M.; LOESER, R. F. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 2, p. 394-403, 2002.

DENOIX, J. M.; JEFFCOTT, L. B.; MCILWRAITH, C. W.; VAN WEEREN, P. R. A review of terminology for equine juvenile osteochondral conditions (JOCC) based on anatomical and functional considerations. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 1, p. 29-35, 2013.

DIERKS, C.; LÖHRING, K.; LAMPE, V.; WITTEW, C.; DRÖGEMÜLLER, C.; DISTL, O. Genome-wide search for markers associated with osteochondrosis in Hanoverian warmblood horses. **Mammalian Genome**, v. 18, n. 10, p. 739-747, 2007.

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

DIMOCK, A. N.; SICILIANO, P. D.; MCILWRAITH, C. W. Evidence supporting an increased presence of reactive oxygen species in the diseased equine joint. **Equine Veterinary Journal**, v.32, n. 5, p. 439-443, 2000.

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

DISTL, O. The genetics of equine osteochondrosis. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 1, p. 13-18, 2013.

DOKKA, S.; SHI, X.; LEONARD, S.; WANG, L.; CASTRANOVA, V.; ROJANASAKUL, Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 280, n. 6, p. L1196-L1202, 2001.

DONOVAN, D. C.; JACKSON, C. A.; COLAHAN, P. T.; NORTON, N.; HURLEY, D. J. Exercise-induced alterations in pro-inflammatory cytokines and prostaglandin F2 α in horses. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 118, n. 3, p. 263-269, 2007.

DOUGLAS, J. Pathogenesis of osteochondrosis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 1. ed. St. Louis: Saunders, 2003. cap 56, p. 534-543.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUKAN, S.; FAREWELL, A.; BALLESTEROS, M.; TADDEI, F.; RADMAN, M.; NYSTRÖM, T. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97,n. 11, p. 5746-5749, 2000.

DYCUS, D. L.; AU, A. Y.; GRZANNA, M. W.; WARDLAW, J. L.; FRONDOZA, C. G. Modulation of inflammation and oxidative stress in canine chondrocytes. **American journal of veterinary research**, v. 74, n. 7, p. 983-989, 2013.

DYSON, S. Lameness and poor performance in the sport horse: dressage, show jumping and horse trials. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, n. 4, pp 145-150, 2001. Trabalho apresentado no World Equine Veterinary Association Congress, 7., 2001, Sorrento, Itália.

EBERLEIN, M.; SCHEIBNER, K. A.; BLACK, K. E.; COLLINS, S. L.; CHAN-LI, Y., POWELL, J. D.; HORTON, M. R. Anti-oxidant inhibition of hyaluronan fragment-induced inflammatory gene expression. **Journal of Inflammation (London, England)**, v. 5, n. 20, 2008. doi:10.1186/1476-9255-5-20.

EGENVALL, A.; BONNET, B.; WATTLE, O.; EMANUELSON, U. Veterinary-care events and costs over a 5-year follow period for warmblooded riding horses with or without previously recorded locomotor problems in Sweden. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 83, n. 2, p. 130-143, 2008.

EGENVALL, A.; TRANQUILLE, C. A.; LÖNNELL, A. C.; BITSCHNAU, C.; OOMEN, A.; HERNLUND, E.; MONTAVON, S.; FRANKO, M. A.; MURRAY, R. C.; WEISHAUPT, M. A.; VAN WEEREN, R.; ROEPSTORFF, L. Days-lost to training and competition in relation to workload in 263 elite show-jumping horses in four European countries. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, n. 3-4, p. 387-400, 2013.

EISENBERG, S. P.; EVANS, R. J.; AREND, W. P.; VERDERBER, E.; BREWER, M. T.; HANNUM, C. H.; THOMPSON, R. C. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. **Nature**, v. 343, n. 6256, p. 341-346, 1990.

EKMAN, S.; CARLSON, C. S. The pathophysiology of osteochondrosis. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 28, n. 1, p. 17-32, 1998.

EKMAN, S.; CARLSON, C. S.; VAN WEEREN. Third International Workshop in Equine Osteochondrosis, Stockholm, 29-30th May, 2008. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 5, p. 504-507, 2009.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-PODIDALO, M. A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Seminars in Immunopathology**, v. 30, n. 3, p. 279-289, 2008.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-PODIDALO, M. A.; ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 53, p. 199-206, 2005.

ELBIM, C.; REGLIER, H.; FAY, M.; DELARCHE, C.; ANDRIEU, V.; EL BENNA, J.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Intracellular pool of IL-10 receptors in specific granules of human neutrophils: differential mobilization by proinflammatory mediators. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 8, p. 5201-5207, 2001.

ENGSTRÖM-LAURENT, A.; HÄLLGREN, R. Circulating hyaluronic acid levels vary with physical activity in healthy subjects and in rheumatoid arthritis patients. Relationship to

synovitis mass and morning stiffness. **Arthritis and Rheumatism**, v. 30, n. 12, p. 1333-1338, 1987.

ESTERBAUER, H.; ZOLLERN, H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. **Free Radical Biology and Medicine**, v.7, n. 2, p.197-203, 1989.

ETHERINGTON, P. J.; WINLOVE, P.; TAYLOR, P.; PALEOLOG, E.; MIOTLA, J. M. VEGF release is associated with reduced oxygen tensions in experimental inflammatory arthritis. **Clinical and experimental rheumatology**, v.20, n. 6, p. 799-805, 2001.

EVANS, C. H.; KRAUS, V. B.; SETTON, L. A. Progress in intra-articular therapy. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 10, n.1, p. 11-22, 2013

EVANS, P. J.; AKANMU, D.; HALLIWELL, B. Promotion of oxidative damage to arachidonic acid and α -1antiproteinase by anti-inflammatory drugs in the presence of the haem proteins myoglobin and cytochrome C. **Biochemical pharmacology**, v. 48, n. 12, p. 2173-2179, 1994.

EVENS, A. M. Motexafin gadolinium: a redox-active tumor selective agent for the treatment of cancer. **Current opinion in oncology**, v.16, n.6, p. 576-580, 2004.

FAIRBURN, K.; GROOTVELD, M.; WARD, R. J.; ABIUKA, C.; KUS, M.; WILLIAMS, R. B.; BLAKE, D. R. Alpha-tocopherol, lipids and lipoproteins in knee-joint synovial fluid and serum from patients with inflammatory joint disease. **Clinical Science**, v. 83, n. 6, p. 657-664, 1992.

FARBER, J. L.; KYLE, M. E.; COLEMAN, J. B. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 62, n. 6, p. 670-679, 1990.

FERMOR, B.; JEFFCOAT, D.; HENNERBICHLER, A.; PISETSKY, D. S., WEINBERG, J. B.; GUILAK, F. The effects of cyclic mechanical strain and tumor necrosis factor alpha on the response of cells of the meniscus. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 12, n. 12, p. 956-962, 2004 b.

FERMOR, B.; WEINBERG J. B.; PISETSKY, D. S.; GUILAK, F. The influence of oxygen tension on matrix turnover and physical properties of articular cartilage. **Proceedings of the 50th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society**, 2004a. San Francisco, CA, abstract 0831.

FERMOR, B.; WEINBERG, J. B.; PISETSKY, D. S.; GUILAK, F. The influence of oxygen tension on the induction of nitric oxide and prostaglandin E2 by mechanical stress in articular cartilage. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 13, n. 10, p. 935-941, 2005.

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

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FIRESTEIN, G. S.; ALVARO-GRACIA, J. M.; MAKI, R.; ALVARO-GARCIA, J. M. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 9, p. 3347-3353, 1990.

FIRTH, E. C. The response of bone, articular cartilage and tendon to exercise in the horse. **Journal of Anatomy**, v. 208, n. 4, p. 513-526, 2006.

FLOHE, L.; HECHT, H. J.; STEINERT, P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9, p. 966-984, 1999.

FORMAN, H. J.; FUKUTO, J. M.; MILLER, T.; ZHAND, H.; RINNA, A.; LEVY, S. The chemistry of cells signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 477, n. 2, p. 183-195, 2008.

FOURNIER, G.; AYOTTE, R. A.; LAURIN, C. A. Pathogenesis of joint effusions: an experimental investigation. **Canadian Medical Association Journal**, v.100, n. 5, p. 242-250, 1969.

FRANCOZ, D.; DESROCHERS, A.; LATOUCHE, J. S. Effect of repeated arthrocentesis and single joint lavage on cytologic evaluation of synovial fluid in 5 young calves. *Canadian journal of veterinary research*, v. 71, n.2, p.129, 2007.

FRENKEL, S. R.; CLANCY, R. M.; RICCI, J. L.; DI CESARE, P. E.; REDISKE, J. J.; ABRAMSON, S. B. Effects of nitric oxide on chondrocyte migration, adhesion, and cytoskeletal assembly. **Arthritis and rheumatism**, v.39, n. 11, p. 1905-1912, 1996.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 14, p. 7761-7764, 1989.

FRISBIE, D. D. Synovial joint biology and pathology. In: AUER, J. A. **Equine Surgery** 1. ed. Philadelphia: Saunders, 2006, p. 1037-1055.

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

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

FRISBIE, D. D.; RAY, C. S.; IONESCU, M.; POOLE, A. R.; CHAPMAN, P. L.; MCILWRAITH, C. W. Measurement of synovial fluid and serum concentrations of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses. **American journal of veterinary research**, v. 60, n. 3, p. 306-309, 1999.

FUCHS, B.; SCHILLER, J. Glycosaminoglycan degradation by selected reactive Oxygen Species. **Antioxidants & redox signaling**, 2013. In press

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

GAETANI, G. F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A. M.; KIRKMAN, H. N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 334-339, 1989.

GALTER, D.; MIHM, S.; DRÖGE, W. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factors κ B and the activator protein-1. **European Journal of Biochemistry**, v. 221, n.2, p. 639-648, 1994.

GARCIA-ARNANDIS, I.; GUILLÉN, M. I.; GOMAR, F.; PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J.; ALCARAZ, M. J. High mobility group box 1 potentiates the pro-inflammatory effects of interleukin-1 β in osteoarthritic synoviocytes. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 4, p. [1-12], 2010.

GEE, E.; DAVIES, M.; FIRTH, E.; JEFFCOTT, L.; FENNESSY, P.; MOGG, T. Osteochondrosis and copper: histology of articular cartilage from foals out of cooper supplemented and non-supplemented dams. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 1, p. 109-117, 2007.

GERBER, H. P.; RYAN, A. M.; KOWALSKI, J.; WERB, Z.; FERRARA, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nature Medicine**, v. 5, n. 6, p. 623-628, 1999.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 11, p. 1106-1114, 2000.

GILLE, G.; SIGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 131-152, 1995.

GLANT, T. T.; MIKECZ, K.; ROUGHLEY, P. J.; BUZAS, E.; POOLE, A. R. Age-related changes in protein-related epitopes of human articular-cartilage proteoglycans. **Biochem. J**, v. 236, p. 71-75, 1986.

GOLDEN, T. R.; MELOV, S. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and aging. **Mechanisms of ageing and development**, v. 122, n. 14, p.1577-1589, 2001.

GOLDRING, M. B.; BIRKHEAD, J.; SANDELL, L. J.; KIMURA, T.; KRANE, S. M. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n. 6, p. 2026-2037, 1988.

GOLDRING, M. B.; GOLDRING, S. R. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, p. 230-237, 2010.

GOLDRING, M. B.; MARCU, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. **Arthritis Research and Therapy**, v. 11, n. 3: 224, 2009.

GOLDRING, M. B.; OTERO, M. Inflammation in osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 23, n. 5, p. 471-478, 2011.

GOLDRING, M. B.; OTERO, M.; TSUCHIMOCHI, K.; IJIRI, K.; LI, Y. Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, p. iii75-82, 2008. Supplement, 3.

GOLDRING, M. B.; TSUCHIMOCHI, K.; IJIRI, K. The control of chondrogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, n. 1, 33-44, 2006.

GOODRICH, L. R. Strategies for reducing the complication of orthopedic pain perioperatively. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 24, n.3, p. 611-620, 2008.

GOODWIN, W.; MCCABE, D.; SAUTER, E.; REESE, E.; WALTER, M.; BUCKWALTER, J. A.; MARTIN, J. A. Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, n. 8, p. 1057-1063, 2010.

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

GRANOWITZ, E. V.; CLARK, B. D.; MANCILLA, J.; DINARELLO, C. A. (1991). Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 266(22), 14147-14150.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science-AAAS-Weekly Paper Edition**, v. 281, n. 5381, p.1309-1311, 1998.

GREENWALD, R. A.; MOY, W. W. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. **Arthritis and Rheumatism**, v. 23, n. 4, p.455-463, 1980.

GREENWALD, R. A.; MOY, W. W. Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. **Arthritis and Rheumatism**, v. 22, n. 3, p. 251-259, 1979.

GRIGOLO, B.; ROSETI, L.; FIORINI, M.; FACCHINI, A. Enhanced lipid peroxidation in synoviocytes from patients with osteoarthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 30, n. 2, p. 345-347, 2003.

GRIMSHAW, M. J.; MASON, R. M. Bovine articular chondrocyte function *in vitro* depends upon oxygen tension. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 8, n.5, p. 386-392, 2000.

GRISHKO, V. I.; HO, R.; WILSON, G. L.; PEARSALL IV, A. W. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, n. 1, p. 107-113, 2009.

GRØNDAHL, A. M.; DOLVIK, N. I. Heritability estimations of osteochondrosis in the tibiotarsal joint and of bony fragments in the palmar/plantar portion of the metacarpo- and metatarsophalangeal joints of horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 1, p. 101-104, 1993.

GUTTERIDGE, J. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. **FEBS letters**, v. 201, n. 2, p. 291-295, 1986.

GÜVEN, O.; TEKIN, U. S.; DURAK, I.; KELLER, E. E.; HATİPOĞLU, M. Superoxide dismutase activity in synovial fluids in patients with temporomandibular joint internal derangement. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 10, p. 1940-1943, 2007.

HA, H.; BOK KWAK, H.; WOONG LEE, S.; MI JIN, H.; KIM, H. M.; KIM, H. H.; HEE LEE, Z. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. **Experimental cell research**, v. 301, n. 2, p. 119-127, 2004.

HADDAD, J. J. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. **Biochemical and biophysical research communications**, v.316, n. 4, p. 969-977, 2004.

HADDAD, J. J.; FAHLMAN, C. S. REDOX- AND OXIDANT-MEDIATED REGULATION OF interleukin-10: an anti-inflammatory, antioxidant cytokine? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 297, n. 2, p. 163-176, 2002.

HADDAD, J. J.; HARB, H. L. L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? **Molecular Immunology**, v. 42, n. 9, p. 987-1014, 2005.

HAINES, R. W. The pseudoepiphysis of the first metacarpal of man. **Journal of Anatomy**, v. 117, p. 145-158, 1974. Part 1.

HALE, A. J.; SMITH, C. A.; SUTHERLAND, L. C.; STONEMAN, V. E.; LONGTHORNE, V.; CILHANE, A. C.; WILLIAMS, G. T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. **European Journal of Biochemistry/ FEBS**, v. 237, n. 3, p. 884, 1996.

HALLIWELL, B. A. R. R. Y.; HOULT, J. R.; BLAKE, D. R. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. **The FASEB journal**, v. 2, n. 13, p. 2867-2873, 1988.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3, p. S14-S22, 1991.

HALLIWELL, B. Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. **Free Radical Research Communications**, v. 5, n. 6, p. 315-318, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Iron as a biological pro oxidant. **ISI Atlas of Science Biochemistry**, p. 48-52, 1988.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 46, n. 2, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 280, n. 1, p. 1-8, 1990.

HAPPONEN, K. E.; SAXNE, T.; ASPBERG, A.; MÖRGELIN, M.; HEINEGÅRD, D.; BLOM, A. Regulation of complement by cartilage oligomeric matrix protein allows for a novel molecular diagnostic principle in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 12, p. 3574-3583, 2010.

HARBO, M.; KOELVRRAA, S.; SERAKINCI, N.; BENDIX, L. Telomere dynamics in human mesenchymal stem cells after exposure to acute oxidative stress. **DNA repair**, v. 11, n. 9, p. 774-779, 2012.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology** v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956.

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

HASHIMOTO, K.; FUKUDA, K.; YAMAZAKI, K.; YAMAMOTO, N.; MATSUSHITA, T.; HAYAKAWA, S.; MUNAKATA, H.; HAMANISHI, C. Hypoxia-induced hyaluronan synthesis by articular chondrocytes: the role of nitric oxide. **Inflammation Research**, v. 55, n. 2, p. 72-77, 2006.

HASHIMOTO, S.; OCHS, R. L.; KOMIYA, S.; LOTZ, M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 9, p. 1632-1638, 1998.

HAUPT, J. L.; FRISBIE, D. D.; MCILWRAITH, C. W.; ROBBINS, P. D.; GHIVIZZANI, S.; EVANS, C. H.; NIXON, A. J. Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 1, p. 118-126, 2005.

HAYAMI, T.; PICKARSKI, M.; ZHUO, Y.; WESOŁOWSKI, G. A.; RODAN, G. A.; DUONG LE, T. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transaction and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone**, v. 38, n. 2, p. 234-243, 2006.

HEINECKE, L. F.; GRZANNA, M. W.; AU, A. Y.; MOCHAL, C. A.; RASHMIR-RAVEN, A.; FRONDOZA, C. G. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n.2, p. 220-227, 2010.

HENDERSON, B.; THOMPSON, R. C.; HARDINGHAM, T.; LEWTHWAITE, J. Inhibition of interleukin-1-induced synovitis and articular cartilage proteoglycan loss in the rabbit knee by recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. **Cytokine**, v. 3, b. 3, p. 246-249, 1991.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HENROTIN, Y. E.; BRUCKNER, P. ; PUJOL, J. P. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 10, p. 747-755, 2003.

HENROTIN, Y.; KURZ, B.; AIGNER, T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 8, p. 643-654, 2005.

HENSON, F. M.; DA VENPORT, C.; BUTLER, L.; MORAN, I.; SHINGLETON, W. D.; JEFFCOTT, L. B.; SCHOFIELD, P. N. Effects of insulin and insulin-like growth factors I and

II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 6, p. 441-447, 1997.

HEYWOOD, H. K.; BADER, D. L.; LEE, D. A. Rate of oxygen consumption by isolated articular chondrocytes is sensitive to medium glucose concentration. **Journal of cellular physiology**, v. 206, n. 2, p. 402-410, 2006.

HILAL, G.; MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J. P.; RANGER, P.; LAJEUNESSE, D. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: Possible role in subchondral bone sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 5, p. 891-899, 1998.

HILBERT, B. J.; ROWLEY, G.; ANTONAS, K. N. Hyaluronic acid concentration in synovial fluid from normal and arthritic joints of horses. **Australian veterinary journal**, v. 61, n. 1, p. 22-24, 1984.

HINCHCLIFF, K. W.; GEOR, R. J. Integrative physiology of exercise. In: HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine Sports Medicine and Surgery**, 1. ed. [S.I.]: Saunders, 2004. Cap. 1, p. 3-8.

HINES, M. T.; SCHOTT, I. I.; HAROLD, C.; BAYLY, W. M.; LEROUX, A. J. Exercise and immunity: a review with emphasis on the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.10, n. 5, p. 280-289, 1996 .

HIRAO, M.; TAMAI, N.; TSUMAKI, N.; YOSHIKAWA, H.; MYOUI, A. Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. **Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 41, p. 31079-31092, 2006.

HOOGEN, B. M.; LEST, C.; WEEREN, P.; GOLDE, L.; Barneveld, A. Changes in proteoglycan metabolism in osteochondrotic articular cartilage of growing foals. **Equine Veterinary Journal**, v.31 n. S31, p. 38-44, 1999.

HOPPE, F. Radiological investigations of osteochondrosis dissecans in standardbred trotters and Swedish warmblood horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 5, p. 425-429, 1984.

HOUBEN, J. M.; MOONEN, H. J.; VAN SCHOOTEN, F. J.; HAGEMAN, G. J. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 3, p. 235-246, 2008.

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

HULTH, A.; JOHNELL, O.; MIYAZONO, K.; LINDBERG, L.; HEINEGARD, D.; HELDIN, C. H. Effect of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB on articular cartilage in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 14, n. 4, p. 547-553, 1996.

HURTIG, M.; GREEN, S. L.; DOBSON, H.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y.; CHOI, J. Correlative study of defective cartilage and bone growth in foals fed a low-copper diet. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. S16, p. 66-73, 1993.

ICHISEKI, T.; UEDA, Y.; KATSUDA, S.; KITAMURA, K.; KANEUJI, A.; MATSUMOTO, T. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. **Rheumatology**, v. 45, n. 3, p. 287-290, 2006.

IM, H. J.; PACIONE, C.; CHUBINSKAYA, S.; VAN WIJNEN, A. J.; SUN, Y.; LOESER, R. F. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment- and interleukin-1 beta-stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 28, p. 25386-25394, 2003.

IVANOVA, E.; IVANOV, B. Mechanisms of the extracellular antioxidant defend. **Experimental pathology and parasitology**, v. 4, p. 49-59, 2000.

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. 17-32, 2000.

IYAMA, S.; OKAMOTO, T.; SATO, T.; YAMAUCHI, N.; SATO, Y.; SASAKI, K.; TAKAHASHI, M.; TANAKA, M.; ADACHI, T.; KOGAWA, K.; KATO, J.; SAKAMAKI, S.; NIITSU, Y. Treatment of murine collagen-induced arthritis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 9, p.2160-2167, 2001.

JACKSON, B. F.; GOODSHIP, A. E.; EASTELL, R.; PRICE, J. S. Evaluation of serum concentrations of biochemical markers of bone metabolism and insulin-like growth factor I associated with treadmill exercise in young horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 12, p. 1549-1556, 2003.

JALLALI, N.; RIDHA, H.; THRASIVOULOU, C.; UNDERWOOD, C.; BUTLER, P. E. M.; COWEN, T. Vulnerability to ROS-induced cell death in ageing articular cartilage: the role of antioxidant enzyme activity. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 13, n. 7, p. 614-622, 2005.

JANG, Y. C., & REMMEN, H. V. The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models. **Experimental gerontology**, v. 44, n. 4, p. 256-260, 2009.

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

JEFFCOTT, L. B. Osteochondrosis in the horse - searching for the key to pathogenesis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 5, p. 331-338, 1991.

JEFFCOTT, L. B. Osteochondrosis—an international problem for the horse industry. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.16, n. 1, p. 32-37, 1996.

JEFFCOTT, L. B.; HENSON, M. D. Studies on growth cartilage in the horse and their application to aetiopathogenesis of dyschondroplasia (osteochondrosis). **The Veterinary Journal**, v. 156, n. 3, p. 177-192, 1998.

JOHANSSON, L. H.; HAKAN BORG, L.A. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. **Analytical biochemistry**, v. 174, n. 1, p. 331-336, 1988.

JOHNSON, K.; JUNG, A.; MURPHY, A.; ANDREYEV, A.; DYKENS, J.; TERKELTAUB, R. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 7, p. 1560-1570, 2000.

JONES, D. L.; BARBER, S. M.; DOIGE, C. E. Synovial fluid and clinical changes after arthroscopic partial synovectomy of the equine middle carpal joint. **Veterinary Surgery**, v. 22, n. 6, p.524-530, 1993.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.

JONES, S. A.; O'DONNELL, V. B.; WOOD, J. D.; BROUGHTON, J. P.; HUGHES, E. J.; JONES, O. T. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 271, n. 4, p. H1626-H1634, 1996.

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

JUDY, C. E.; GALUPPO, L. D. Evaluation of iatrogenic hemarthrosis of the metacarpophalangeal joint as a method of induction of temporary reversible lameness in horses. **American journal of veterinary research**, v. 66, n. 6, p.1084-1089. 2005.

JÜPPNER, H. Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. **Pediatric Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 606-611, 2000.

KAIKI, G.; TSUJI, H.; YONEZAWA, T.; SEKIDO, H.; TAKANO, T.; YAMASHITA, S.; SANO, A. Osteoarthritis induced by intra-articular hydrogen peroxide injection and running load. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 8, n. 5, 731-740, 1990.

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

KAMPSCHMIDT, R. F.; WORTHINGTON, M. L.; MESECHER, M. I. Release of interleukin-1 (IL-1) and IL-1-like factors from rabbit macrophages with silica. **Journal of leukocyte biology**, v. 39, n. 2, p. 123-132, 1986.

KANE, A. J.; PARK, R. D.; MCILWRAITH, C. W.; RANTANEN, N. W.; MOREHEAD, J. P.; BRAMLAGE, L. R. Radiographic changes in thoroughbred yearlings. Part 1: prevalence at the time of the yearling sales. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 4, p. 354-365, 2003.

KANEKO, M.; PANAGIA, V.; PAOLILLO, G.; MAJUMDER, S.; OU, C.; DHALLA, N. S. Inhibition of cardiac phosphatidylethanolamine N-methylation by oxygen free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 102, n. 1, p. 33-38, 1990.

KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J. P.; FAHMI, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 1, p. 33-42, 2011.

KARAHALIL, B.; HOGUE, B. A.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; BOHR, V. A. (2002). Base excision repair capacity in mitochondria and nuclei: tissue-specific variations. *The FASEB journal*, 16(14), 1895-1902.

KARSDAL, M. A.; BAY-JENSEN, A. C.; LORIES, R. J.; ABRAMSON, S.; SPECTOR, T.; PARTOUREAU, P.; CHRISTIANSEN, C.; ATTUR, M.; HENRIKSEN, K.; GOLDRING, S. R.; KRAUS, V. The coupling of bone and cartilage turnover in osteoarthritis: opportunities for bone antiresorptives and anabolics as potential treatments? **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 2, p. 336-348, 2014.

KATSIKIS, P. D.; CHU, C. Q.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 5, p. 1517-1527, 1994.

KATZ, J.D.; VELASQUEZ, M.T. Oxidative stress at the Crossroads Between Osteoarthritis and Metabolic Syndrome. In: ALCARAZ, M. J. (Ed.) **Studies on Arthritis and Joint Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice**. New York: Springer, 2013, cap.12, p. 223-236.

KAWANISHI, S.; OIKAWA, S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1019, p. 278-284, 2004.

KAWCAK, C. E.; FRISBIE, D. D.; TROTTER, G. W.; MCILWRAITH, C. W.; GILLETTE, S. M.; POWERS, B. E.; WALTON, R. M. Effects of intravenous administration of sodium hyaluronate on carpal joints in exercising horses after arthroscopic surgery and osteochondral fragmentation. **American journal of veterinary research**, v.58, n.10, p.1132, 1997.

KAWCAK, E. C.; MCILWRAITH, C. W.; NORRDIN, R. W.; PARK, R. D.; JAMES, S. P. The role of subchondral bone in joint disease: a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 2, p. 120-126, 2001.

KERN, J. C.; KEHRER, J. P. Free radicals and apoptosis: relationships with glutathione, thioredoxin, and the BCL family of proteins. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 10, p. 1727-1738, 2005.

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

KIM, H. A.; BLANCO, F. J. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. **Current Drug Targets**, v. 8, n. 2, p. 333-345, 2007.

KIM, H. A.; CHOI, H. Y.; YOON, C. S.; JHUN, J. Y.; OH, H. J.; KIM, H. Y. The catabolic pathway mediated by toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 7, p. 2152-2163, 2006.

KIM, H. A.; LEE, Y. J.; SEONG, S. C.; CHOE, K. W.; SONG, Y. W. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 27, n. 2, p. 455-462, 2000.

KIM, K. S.; CHOI, H. W.; YOON, H. E.; KIM, I. Y. Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for chondrogenic differentiation. **Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 51, p. 40294-40302, 2010.

- KIRKLAND, J. B. Lipid peroxidation, protein thiol oxidation and DNA damage in hydrogen peroxide-induced injury to endothelial cells: role of activation of poly (ADP-ribose) polymerase. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1092, n. 3, p. 319-325, 1991.
- KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B. D.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 178-191, 2008.
- KNIGHT, D. A.; WEIBRODE, S. E.; SCHAMLL, L. M.; REED, S. M.; GABEL, A. A.; BRAMLAGE, L. R.; TYZNIK, W. I. The effects of copper supplementation on the prevalence of cartilage lesions in foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 6, p. 426-432, 1990.
- KNUDSON, C. B.; KNUDSON, W. Cartilage proteoglycans. **In Seminars in cell & developmental biology**, v. 12, n. 2, p. 69-78, 2001.
- KONTTINEN, Y. T.; CEPONIS, A.; MERI, S.; VUORIKOSKI, A.; KORTEKANGAS, P.; SORSA, T.; SUKURA, A.; SANTAVIRTA, S. Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 55, n. 12, p. 888-894, 1996.
- KRAMER, W. C.; HENDRICKS, K. J.; WANG, J. Pathogenetic mechanisms of posttraumatic osteoarthritis: opportunities for early intervention. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 4, n. 4, p. 285-298, 2011.
- KRASNOKUTSKY, S.; BELITSKAYA-LÉVY, I.; BENCARDINO, J.; SAMUELS, J.; ATTUR, M.; REGATTE, R.; ROSENTHAL, P.; GREENBERG, J.; SCHWEITZER, M.; ABRAMSON, S. B.; RYBAK, L. Quantitative magnetic resonance imaging evidence of synovial proliferation is associated with radiographic severity of knee osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n.10, p. 2983-2991, 2011.
- KRAUS, V. B.; HUEBNER, J. L.; FINK, C.; KING, J. B.; BROWN, S.; VAIL, T. P.; GUILAK, F. Urea as a passive transport marker for arthritis biomarker studies. **Arthritis and rheumatism**, v.46, n.2, p., 420-427, 2002.
- KRAUS, V. B.; STABLER, T. V.; KONG, S. Y.; VARJU, G.; MCDANIEL, G. Measurement of synovial fluid volume using urea. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 10, p. 1217-1220, 2007.
- KROLL, A.; HERTSCH, B.; HÖPPNER, S. Entwicklung osteochondraler Veränderungen in der Fessel- und Talokruralgelenken im Röntgenbild beim Föhlen. **Pferdeheilkunde**, v. 17, p. 489-500, 2001.
- KRONENBERG, H. M. Developmental regulation of the growth plate. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 332-336, 2003.
- KÜHN, K.; D'LIMA, D. D.; HASHIMOTO, S.; LOTZ, M. Cell death in cartilage. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2004.
- KUJOTH, G. C.; HIONA, A.; PUGH, T. D.; SOMEYA, S.; PANZER, K.; WOHLGEMUTH, S. E.; SEO, A. Y. H.; SULLIVAN, R.; JOBLING, W. A.; MORROW, J. D.; VAN REMMEN, H.; SEDIVY, J. M.; YAMASOBA, T.; TANOKURA, M.; WEINDRUCH, R. ;

LEEUEWENBURGH, C.; PROLLA, T. A. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 481-484, 2005.

KURZ, B.; LEMKE, A.; KEHN, M.; DOMM, C.; PATWARI, P.; FRANK, E. H.; ... & SCHÜNKE, M. Influence of tissue maturation and antioxidants on the apoptotic response of articular cartilage after injurious compression. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n.1, p. 123-130, 2004.

KUSHNER, I.; SOMERVILLE, J. A. Permeability of human synovial membrane to plasma proteins. Relationship to molecular size and inflammation. **Arthritis and rheumatism**, v. 14, n.5, p.560-570, 1971.

LAFEBER, F. P. J. G.; VAN SPIL, W. E. Osteoarthritis year 2013 in review: biomarkers; reflecting before moving forward, one step at a time. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 10, p. 1452-1464, 2013.

LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P. Subchondral bone in osteoarthritis: A biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 15, n. 5, p. 628-633, 2003.

LAUFS, U.; ADAM, O.; STREHLOW, K.; WASSMANN, S.; KONKOL, C.; LAUFS, K., SCHMIDT, W.; BÖHM, M.; NICKENIG, G. Down-regulation of Rac-1 GTPase by estrogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 8, p. 5956-5962, 2003.

LAURENT, T. C.; FRASER, J. R. E. Hyaluronan. **FASEB Journal**, v. 6, n. 7, p. 2397-2404, 1992.

LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B.; FRASER, J. R. E. The structure and function of hyaluronan: An overview. **Immunology & Cell Biology**, v. 74, n. 2, p. A1-7, 1996.

LAURINDO, I. M. M; MELLO, S. B. V. D.; NOVAES, G. D. S.; PALACIOS, F. A. S.; YOSHINARI, N. H. Participação dos radicais livres na inflamação articular. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 52, n. 2, p.72-9,1997.

LAVERTY, S.; GIRARD, C. Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 1, p. 3-12, 2013.

LAVERTY, S.; IONESCU, M.; MARCOUX, M.; BOURE, L.; DOIZE, B.; POOLE, A. R. Alterations in cartilage type-ii procollagen and aggrecan contents in synovial fluid in equine osteochondrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v.18, n. 3, p. 399-405, 2000.

LECHMAN, E. R.; JAFFURS, D.; GHIVIZZANI, S. C.; GAMBOTTO, A.; KOVESDI, I.; MI, Z.; EVANS, C. H.; ROBBINS, P. D. Direct adenoviral gene transfer of viral IL-10 to rabbit knees with experimental arthritis ameliorates disease in both injected and contralateral control knees. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 4, p. 2202-2208, 1999.

LEDDY, H. A.; GUILAK, F. Site-specific effects of compression on macromolecular diffusion in articular cartilage. **Biophysical journal**, v. 95, n. 10, p. 4890-4895, 2008.

LEE, A. S.; ELLMAN, M. B.; YAN, D.; KROIN, J. S.; COLE, B. J.; VAN WIJNEN, A. J.; IM, H. J. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. **Gene**, v. 527, n. 2, p. 440-447, 2013.

LEE, N. K.; SOWA, H.; HINOI, E.; FERRON, M.; AHN, J. D.; ROMAIN DACQUIN, C. C.; MEE, P.J.; MCKEE, M.D.; JUNG, D.Y.; ZHANG Z.; KIM, J.K.; MAUVAIS-JARVIS, F.; DUCY P.; KARSENTY, G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456-469, 2007.

LEE, R. B.; URBAN, J. P. Functional replacement of oxygen by other oxidants in articular cartilage. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 12, p. 3190-3200, 2002.

LEFEBVRE, V.; SMITS, P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. **Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews**, v. 75, n. 3, p. 200-212, 2005.

LEJEUNE, J. P.; FRANCK, T.; GANGL, M.; SCHENEIDER, N.; MICHAUX, C.; DEBY-DUPONT, G.; SERTEYN, D. Plasma concentration of insulin-like growth factor I (IGF-I) in growing Ardenner horses suffering from juvenile digital degenerative osteoarthropathy. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 2, p. 185-195, 2007.

LEPEULE, J.; BAREILLE, N.; ROBERT, C.; EZANNO, P.; VALETTE, J. P.; JACQUET, S.; BLANCHARD, G.; DENOIX, J. M.; SEEGER, H. Association of growth, feeding practices and exercise conditions with the prevalence of developmental orthopaedic disease in limbs of French foals at weaning. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 89, n. 3-4, p. 167-177, 2009.

LEPEULE, J.; BAREILLE, N.; ROBERT, C.; VALETTE, J. P.; JACQUET, S.; BLANCHARD, G.; DENOIX, J. M.; SEEGER, H. Association of growth, feeding practices and exercise conditions with the severity of the osteoarticular status of limbs in French foals. **The veterinary Journal**, v. 197, n.1, p. 65-71, 2013.

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

LI, D.; XIE, G.; WANG, W. Reactive oxygen species: the 2-edged sword of osteoarthritis. **The American journal of the medical sciences**, v. 344, n. 6, p. 486-490, 2012.

LI, N.; KARIN, M. Is NF-kappa B the sensor of oxidative stress? **FASEB Journal**, v. 13, n. 10, p. 1137-1143, 1999.

LIM, H.; KIM, H. P. Matrix metalloproteinase-13 expression in IL-1 β -treated chondrocytes by activation of the p38 MAPK/c-Fos/AP-1 and JAK/STAT pathways. **Archives of pharmacal research**, v. 34, n. 1, p. 109-117, 2011.

LIPPIELLO, L.; WALSH, T.; FIENHOLD, M. The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. **Metabolism**, v. 40, n. 6, p. 571-576, 1991.

LIU, X.; XU, Y.; CHEN, S.; TAN, Z.; XIONG, K.; LI, Y.; Xiaozhen L.; XU, Y.; CHEN, S.; TAN, Z.; XIONG K. LI, Y.; YE, Y., LUO, Z. P.Z; HE, F.; GONG, Y. Rescue of

proinflammatory cytokine-inhibited chondrogenesis by the antiarthritic effect of melatonin in synovium mesenchymal stem cells via suppression of reactive oxygen species and matrix metalloproteinases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 234-246, 2014.

LIU-BRYAN, R. Synovium and the innate inflammatory network in osteoarthritis progression. **Current Rheumatology Reports**, v. 15, n. 5: 323, p. 1-7, 2013.

LOESER, R. F. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocytes senescence and aging changes in the cartilage matrix. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, n. 8, p. 971-979, 2009.

LOESER, R. F. Jr. Aging cartilage and osteoarthritis – what's the link? **Science of Aging Knowledge Environment**, v. 2004, n. 29: pe31, 2004.

LOESER, R. F. Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. **Journal of Musculoskeletal and neuronal interactions**, v. 8, n. 4, p. 303-306, 2008.

LOESER, R. F. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 5, p. 1357-1360, 2006.

LOESER, R. F.; CARLSON, C. S.; CARLO, M. D.; COLE, A. Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1 β and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 9, p. 2349-2357, 2002.

LOESER, R. F.; GOLDRING, S. R.; SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, M. B. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64 n. 6, p. 1697-1707, 2012.

LOTZ, M. K. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. **Arthritis Research and Therapy**, v. 12, n. 3:211, 2010.

LUNEC, J.; HALLORAN, S. P.; WHITE, A. G.; DORMANDY, T. L. Free-radical oxidation (peroxidation) products in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 8, n.2, p. 233-245, 1980.

LYKKESFELDT, J. Measurement of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples. In: MAINES, M.; COSTA, L.G.; HODSON, E.; REED, D.J.; SIPES, I.G. (Eds.) **Current Protocols in Toxicology**. John Wiley and Sons, New York, 2002, cap. 7, p. 7.6.1–7.6.15.

LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 3, p. 502-511, 2007.

LYRAS, L. A.; EVANS, P. J.; SHAW, P. J.; INCE, P. G.; HALLIWELL, B. Oxidative damage and motor neurone disease difficulties in the measurement of protein carbonyls in human brain tissue. **Free radical research**, v. 24, n. 5, p. 397-406, 1996.

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

MACHADO, T. S. L.; DAGLI, M. L. Z.; COSTA-PINTO, F. A.; MICHELACCI, Y. M. C.; BACCARIN, R. Y. A.; SILVA L. C. L. C. Synovial membrane evaluation of equine tibiotarsal joints with osteochondritis dissecans (OCD). In: **XXIII Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, 2012, Cartagena de Indias, Anais: CD-rom.

MACKIE, E. J.; AHMED, Y. A.; TATARCZUCH, K. S.; CHEN, M.; MIRAMS, M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 1, p. 46-62, 2008.

MAJEWSKI, M.; OCHSNER, P. E.; LIU, F.; FLÜCKIGER, R.; EVANS, C. H. Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum. **The American journal of sports medicine**, v. 37, n. 11, p. 2117-2125, 2009.

MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H.; SUMA, T.; CHATTERJEE, S.; CHAKRABARTI, A.; SINGH, T. A. Evidence for oxidative stress in osteoarthritis. **Indian journal of clinical Biochemistry**, v.20, n. 1, p. 129-130, 2005.

MAOR, G.; HOCHBERG, Z.; SIBERMANN, M. Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles. **Acta Endocrinologica**, v. 1228, n. 1, p. 56-64, 1993.

MARKLUND, S. L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. **The Biochemical Journal**, v. 222, n. 3, p. 649-655, 1984.

MARKLUND, S. L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 24, p. 7634-7638. 1982.

MARKLUND, S. L.; BJELLE, A.; ELMQVIST, L. G. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 45, n. 10, p. 847-851, 1986.

MARKLUND, S. L.; HOLME, E.; HELLNER, L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. **Clinica Chimica Acta**, v.126, n. 1, p. 41-51, 1982.

MARKOVIC, J.; BORRÁS, C.; ORTEGA, A.; SASTRE, J.; VIÑA, J.; PALLARDÓ, F. V. Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20416-20424, 2007.

MARTEL-PELLETIER, J.; MCCOLLUM, R.; DIBATTISTA, J.; FAURE, M. P.; CHIN, J. A.; FOURNIER, S.; SARFATI, M.; PELLETIER, J. P. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. **Arthritis and Rheumatism**, v. 35, n. 5, p. 530-540, 1992.

MARTIN, J. A.; BUCKWALTER, J. A. Human chondrocyte senescence and osteoarthritis. **Biorheology**, v. 39, n. 1, p. 145-152, 2002.

MARTIN, J. A.; BUCKWALTER, J. A. Post-traumatic osteoarthritis: the role of stress induced chondrocyte damage. **Biorheology**, v. 43, n. 3, p. 517-521, 2006.

MARTIN, J. A.; BUCKWALTER, J. A. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85-A, p. 106-110, 2003. Supplement, 2.

MARTIN, J. A.; BUCKWALTER, J. A. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 56, n. 4, p. B172-B179, 2001.

MARTIN, J. A.; MARTINI, A.; MOLINARI, A.; MORGAN, W.; RAMALINGAM, W.; BUCKWALTER, J. A.; MCKINLEY, T. O. Mitochondrial electron transport and glycolysis are coupled in articular cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 4, p. 323-329, 2012.

MARTIN, J. A.; MCCABE, D.; WALTER, M.; BUCKWALTER, J. A.; MCKINLEY, T. O. N-acetylcysteine inhibits post-impact chondrocyte death in osteochondral explants. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 91, n.8, p. 1890-1897, 2009.

MARTIN, R. B. Targeted bone remodeling involves BMU steering as well as activation. **Bone**, v. 40, n. 6, p. 1574-1580, 2007.

MASSY, Z. A.; NGUYEN-KHOA, T. Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. **Journal of nephrology**, v. 15, n. 4, p. 336-341, 2001.

MATHY-HARTERT, M.; HOGGE, L.; SANCHEZ, C.; DEBY-DUPONT, G.; CRIELAARD, J. M.; HENROTIN, Y. Interleukin-1 β and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. **Osteoarthritis and cartilage**, v.16, n. 7, p.756-763, 2008.

MAY, S. A.; LEES, P.; HOOKE, R. E.; PEREMANS, K. Y.; VERSCHOOTEN, F. Prostaglandin E₂ in equine joint disease. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.63, p.1-5, 1994.

MAZZETTI, I.; GRIGOLO, B.; PULSATELLI, L.; DOLZANI, P.; SILVESTRI, T.; ROSETI, L.; MELICONI, R.; FACCHINI, A. Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Clinical Science**, v. 101, n. 6, p. 593-599, 2001.

MCANULTY, S.; MCANULTY, L.; NIEMAN, D.; MORROW, J.; DUMKE, C.; HENSON, D. Effect of NSAID on muscle injury and oxidative stress. **International journal of sports medicine**, v.28, n. 11, p. 909-915, 2007.

MCCORD, J. M. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. **Science**, v. 185, n. 4150, p. 529-531, 1974.

MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 3, p.159-163, 1985.

MCCORD, J. M.; CRAPO, J. D.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase assays: A review of methodology. **Superoxide and superoxide dismutases**, p.11-17, 1977.

MCCOY, A. M.; TOTH, F.; DOLVIK, N. I.; EKMAN, S.; ELLERMANN, J.; OLSTAD, K.; YTREHUS, B.; CARLSON, C. S. Articular osteochondrosis: a comparison of naturally-

occurring human and animal disease. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 11, p. 1638-1647, 2013.

MCDEVITT, C. A.; BECK, G. J.; CIUNGA, M. J.; O'BRIEN, J. Cigarette smoke degrades hyaluronic acid. **Lung**, v. 167, n. 1, p. 237-245, 1989.

MCGONAGLE, D.; LYN TAN, A.; CAREY, J.; BENJAMIN, M. The anatomical basis for a novel classification of osteoarthritis and allied disorders. **The Journal of Anatomy**, v. 216, n. 3, p. 279-291, 2010.

MCILWRAITH, C. W. Surgical versus conservative management of osteochondrosis. **The Veterinary Journal**, v. 197, n.1, p. 19-28., 2013.

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.

MCNEIL, J. D.; WIEBKIN, O. W.; BETTS, W. H.; CLELAND, L. G. Depolymerisation products of hyaluronic acid after exposure to oxygen-derived free radicals. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 44, n. 11, p. 780-789, 1985.

MEIJER, H.; REINECKE, J.; BECKER, C.; THOLEN, G.; WEHLING, P. The production of anti-inflammatory cytokines in whole blood by physico-chemical induction. **Inflammation Research**, v. 52, n. 10, p. 404-407, 2003.

MENGSHOL, J. A., MIX, K. S., & BRINCKERHOFF, C. E. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritic diseases: Bull's-eye or missing the mark? **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 1, p. 13-20, 2002.

MERRY, P.; GROOTVELD, M.; LUNEC, J.; BLAKE, D. R. Oxidative damage to lipids within the inflamed human joint provides evidence of radical-mediated hypoxic-reperfusion injury. **The American journal of clinical nutrition**, v. 53, n. 1, p. 362S-369S, 1991.

MEYER, K.; HOBBY, G. L.; CHAFFEE, E.; DAWSON, M. H. The hydrolysis of hyaluronic acid by bacterial enzymes. **The Journal of experimental medicine**, v.71, n.2, p.137-146, 1940

MEYER, K.; SMYTH, E. M.; DAWSON, M. H. The isolation of a mucopolysaccharide from synovial fluid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 319-327, 1939.

MICHIELS, C.; RAES, M.; PIGEOLET, E.; CORBISIER, P.; LAMBERT, D.; REMACLE, J. Importance of a threshold for error accumulation in cell degenerative processes. I. Modulation of the threshold in a model of free radical-induced cell degeneration. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 51, n. 1, p. 41-54, 1990.

MIDDLETON, K. K.; BARRO, V.; MULLER, B.; TERADA, S.; FU, F. H. Evaluation of the Effects of Platelet-Rich Plasma (PRP) Therapy Involved in the Healing of Sports-Related Soft Tissue Injuries. **The Iowa orthopaedic journal**, v. 32, n. 150-163, 2012.

MILLAR, T. M.; PHAN, V.; TIBBLES, L. AROS generation in endothelial hypoxia and reoxygenation stimulates MAP kinase signaling and kinase-dependent neutrophil recruitment. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 8, p. 1165-1177, 2007.

MILNER, P. I.; FAIRFAX, T. P. A.; BROWNING, J. A.; WILKINS, R. J.; GIBSON, J. S. The effect of O₂ tension on pH homeostasis in equine articular chondrocytes. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 11, p. 3523-3532, 2006.

MIURA, T.; MURAOKA, S.; FUJIMOTO, Y. Lipid peroxidation induced by phenylbutazone radicals. **Life sciences**, v. 70, n. 22, p.2611-2621, 2002.

MOBASHERI, A. Role of chondrocyte death and hypocellularity in ageing human articular cartilage and the pathogenesis of osteoarthritis. **Medical Hypotheses**, v. 58, n. 3, p. 193-197, 2002.

MOBASHERI, A., RICHARDSON, S., MOBASHERI, R., SHAKIBAEI, M., & HOYLAND, J. A. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. **Histology and histopathology**, v. 20, n. 4, p. 1327-1338, 2005.

MOHAN SURAPANENI, K., & VENKATARAMANA, G. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis. **Indian journal of medical sciences**, v.61, n. 1, p. 9-14, 2007.

MORITA, K.;MIYAMOTO, T.; FUJITA, N.; KUBOTA, Y.; ITO, K.; TAKUBO, K.; SUDA, T. Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 7, p.1613-1623, 2007.

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

MORROW, J. D., HILL, K. E., BURK, R. F., NAMMOUR, T. M., BADR, K. F., & ROBERTS, L. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.87, n. 23, p .9383-9387, 1990.

MORROW, J. D.; ROBERTS, L. J. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. **Progress in lipid research**, v.36, n. 1, p.1-21, 1997.

MORTON, A. J.; CAMPBELL, N. B.; REDDING, W. R.; BLIKSLAGER, A. T. Preferential and non-selective cyclooxygenase inhibitors reduce inflammation during lipopolysaccharide-induced synovitis. **Research in veterinary science**, v. 78, n. 2, p. 189-192, 2005.

MOSELEY, R.; WADDINGTON, R.; EVANS, P.; HALLIWELL, B.; EMBERY, G. The chemical modification of glycosaminoglycan structure by oxygen-derived species in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1244, n. 2, p. 245-252, 1995.

MOW, V. C.; RATCLIFFE, A.; ROBIN POOLE, A. (1992). Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials*, 13(2), 67-97.

MUELLER, M. B.; TUAN, R. S. Anabolic/catabolic balance in pathogenesis os osteoarthritis: indentifying molecular targets. **PM&R: The Journal of Injury, Function and Rehabilitation**, v. 3, p. S3-11, 2011. Supplement 1.

- MURAKAMI, K. I.; SHIBATA, T.; KUBOTA, E.; MAEDA, H. Intra-articular levels of prostaglandin E₂, hyaluronic acid, and chondroitin-4 and-6 sulfates in the temporomandibular joint synovial fluid of patients with internal derangement. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 56, n. 2, p. 199-203, 1998.
- MURPHY, G.; NAGASE, H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? **Nature Clinical Practice. Rheumatology**, v. 4, n. 3, p. 128-135, 2008.
- MURPHY, M. How mitochondria produce reactive oxygen species. **The Biochemical Journal**, v. 417, p. 1-13, 2009.
- MURPHY, M. P.; HOLMGREN, A.; LARSSON, N. G.; HALLIWELL, B.; CHANG, C. J.; KALYANARAMAN, B.; WINTERBOURN, C. C. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell metabolism**, v.13, n. 4, p. 361-366, 2011.
- MURRAY, R. C.; DEATON, C. M.; SMITH, N. C.; HENLEY, W. E.; MARLIN, D. J. Neither age nor osteoarthritis is associated with synovial fluid antioxidant disturbance or depletion in the horse. **Comparative Exercise Physiology**, v. 6, n. 03, p. 121-128, 2009.
- MURRAY, R.C.; WALTERS, J. M.; SNART, H.; DYSON, S.; PARKIN, T. D. H. Identification of risk factors for lameness in dressage horses. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 27-36, 2010.
- MYINT, P.; DEEBLE, D. J.; BEAUMONT, P. C.; BLAKE, S. M.; PHILLIPS, G. O. The reactivity of various free radicals with hyaluronic acid: steady-state and pulse radiolysis studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects**, v.925, n. 2, p. 194-202, 1987.
- NAIK, E.; DIXIT, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 3, p. 417-420, 2011.
- NAIR, A. KANDA, V.; BUSH-JOSEPH, C.; VERMA, N.; CHUBINSKAYA, S.; MIKECZ, K.; GLANT, T. T.; MALFAIT, A. M.; CROW, M. K.; SPEAR, G. T.; FINNEGAN, A.; SCANZELLO, C. R. Synovial fluid from patients with early osteoarthritis modulates fibroblast-like synoviocyte responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 ligands via soluble CD14. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 7, p. 2268-2277, 2012.
- NICOTERA, P.; MOORE, M.; MIRABELLI, F.; BELLOMO, G.; ORRENIUS, S. Inhibition of hepatocyte plasma membrane Ca⁺² ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiols. **FEBS letters**, v. 181, n. 1, p. 149-153, 1985.
- NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. Membrane damage due to lipid oxidation. **The American journal of clinical nutrition**, v. 53, n. 1, p. 201S-205S, 1991.
- NOTOYA, K.; JOVANOVIC, D. V.; REBOUL, P.; MARTEL-PELLETIER, J.; MINEAU, F.; PELLETIER, J. P. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E₂ via the induction of cyclooxygenase-2. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 6, p. 3402-3410, 2000.
- O'DOWD, Y. M.; EL-BENNA, J.; PERIANIN, A.; NEWSHOLME, P. Inhibition of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated respiratory burst in human neutrophils by

adrenaline: inhibition of Phospholipase A2 activity but not p47phox phosphorylation and translocation. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 183-190, 2004.

OGSTON, A. G., & STANIER, J. E. The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties. **The Journal of physiology**, v. 119, n. 2-3, p. 244-252, 1953.

OKAZAKI, K.; JINGUSHI, S.; IKENOUE, T.; URABE, K.; SAKAI, H.; OHTSURU, A.; AKINO, K.; YAMASHITA, S.; NORIURA, S.; IWAMOTO, Y. Expression of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in developing osteophytes in murine experimental osteoarthritis and in rats inoculated with growth hormone-secreting tumor. **Endocrinology**, v. 140, n. 10, P. 4821-4830, 1999.

OLSSON, S. E.; REILAND, S. The nature of osteochondrosis in animals. Summary and conclusions with comparative aspects on osteochondritis dissecans in man. **Acta Radiologica**, v. 358, p. 299-306, 1978. Supplement.

OLSTAD, K.; YTREHUS, B.; EKMAN, S.; CARLSON, C. S.; DOLVIK, N. I. Epiphyseal cartilage canal blood supply to the tarsus of foals and relationship to osteochondrosis. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 1, p. 30-39, 2008.

OLSZEWSKA-SŁONINA, D. M.; MATEWSKI, D.; DREWA, G.; WOŹNIAK, A.; CZAJKOWSKI, R.; RAJEWSKI, P.; ZEGARSKA, B. Oxidative equilibrium in the prophylaxis of degenerative joint changes: an analysis of pre-and postoperative activity of antioxidant enzymes in patients with hip and knee osteoarthritis. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 16, n. 5, p. CR238-45, 2010.

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, v. 117, n. 4, p. 1162-1172, 2000.

ORRENIUS, S., MCCONKEY, D. J., BELLOMO, G., & NICOTERA, P. Role of Ca^{+2} in toxic cell killing. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 281-285, 1989.

OSTAŁOWSKA, A.; KASPERCZYK, S.; KASPERCZYK, A.; SŁOWIŃSKA, L.; MARZEC, M.; STOŁTNY, T.; BIRKNER, E. Oxidant and anti-oxidant systems of synovial fluid from patients with knee post-traumatic arthritis. **Journal of orthopaedic research**, v. 25, n. 6, p. 804-812, 2007

OSTAŁOWSKA, A.; BIRKNER, E.; WIECHA, M.; KASPERCZYK, S.; KASPERCZYK, A.; KAPOLKA, D.; ZON-GIEBEL, A. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 14, n. 2, p. 139-145. 2006.

OWENS, J. G.; KAMERLING, S. G.; STANTON, S. R.; KEOWEN, M. L.; PRESCOTT-MATHEWS, J. S. Effects of pretreatment with ketoprofen and phenylbutazone on experimentally induced synovitis in horses. **American journal of veterinary research**, v. 57, n. 6, p. 866-874, 1996.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE W. N. Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 70, n.1. p. 158-169, 1967.

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

PANGANAMALA, R. V.; SHARMA, H. M.; SPRECHER, H.; GEER, J. C.; CORNWELL, D. G. A suggested role for hydrogen peroxide in the biosynthesis of prostaglandins. **Prostaglandins**, v. 8, n. 1, p. 3-11, 1974.

PANTSULAIA, I.; KALICHMAN, L.; KOBLYANSKY, E. Association between radiographic hand osteoarthritis and RANKL, OPG and inflammatory markers. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 11, p. 1448-1453, 2010.

PASTOUREAU, P. C.; CHOMEL, A. C.; BONNET, J. Evidence of early subchondral bone changes in the meniscectomized guinea pig. A densitometric study using dual-energy X-ray absorptionmetry subregional analysis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 7, n. 5, p. 466-473, 1999.

PEARCE, S. G.; FIRTH, E. C.; GRACE, N. D.; FENNESSY, P. F. Effect of copper supplementation on the evidence of developmental orthopaedic disease in pasture-fed new Zealand thoroughbreds. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n. 3, p. 211-218, 1998.

PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J.; ABRAMSON, S. B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 6, p. 1237-1247, 2001.

PELLETIER, J. P.; TRONCY, E.; BERTAIM, T.; THIBAUD, D.; GOULET, A. C.; ABRAM, F.; CARON, J.; BOILEAU, C.; D'ANJOU, M. A.; MOREAU, M.; LUSSIER, B.; MARTEL-PELLETIER, J. Treatment with tiludronic acid helps reduce the development of experimental osteoarthritis lesions in dogs with anterior cruciate ligament transection followed by reconstructive surgery: a 1-year study with quantitative magnetic resonance imaging. **The Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 1, p. 118-128, 2011.

PENELL, J. C.; EGENVALL, A.; BONNETT, B. N.; OLSON, P.; PRINGLE, J. Specific causes of morbidity among Swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000. **The Veterinary Record**, v. 157, n. 16, p. 470-477, 2005.

PERSSON, L. On the synovia in horses. A clinical and experimental study. **Acta veterinaria Scandinavica**, p. 3-77, 1971. Supplement, n.35.

PETERSSON, I. F.; BOEGÅRD, T.; DAHLSTRÖM, J.; SVENSSON, B.; HEINEGÅRD, D.; SAXNE, T. Bone scan and serum markers of bone and cartilage in patients with knee pain and osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 6, n. 1, p.33-39, 1998 a.

PETERSSON, I. F.; BOEGÅRD, T.; SVENSSON, B.; HEINEGÅRD, D.; SAXNE, T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. **Rheumatology**, v. 37, n.1, p.46-50, 1998b.

PETIT, P. X.; ZAMZAMI, N.; VAYSSIÈRE, J. L.; MIGNOTTE, B.; KROEMER, G.; CASTEDO, M. Implication of mitochondria in apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 174, n. 1-2, p. 185-188, 1997.

PETTIT, A. R.; JI, H.; VON STECHOW, D.; MÜLLER, R.; GOLDRING, S. R.; CHOI, Y.; BENOIST, C.; GRAVALLESE, E. M. TRANCE/ RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 5, p. 1689-1699, 2001.

PHILCHENKOV, A.; ZAVELEVICH, M.; KROCZAK, T. J.; LOS, M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. **Experimental Oncology**, v. 26, n. 2, p. 82-97, 2004.

PHILIPSSON, J.; ANDRÉASSON, E.; SANDGREN, B.; DALIN, G.; CARLSTEN, J. Osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints in standardbred trotters. II. Heritability. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. S16, p. 38-41, 1993.

PHILIPSSON, J. Pathogenesis of osteochondrosis – genetic implications. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint Disease in the Horse**. 1. ed. Philadelphia: Saunders, 1996. Cap 21, p. 359-362.

PICCININI, A. M.; MIDWOOD, K. S. DAMPening inflammation by modulating TLR signaling. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, [21 pags.], 2010. [Article ID 672395]

PLATT, D. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint Disease in the Horse**. 1. ed. Philadelphia: Saunders, 1996. Cap 6, p. 29-40.

PODEROSO, J. J.; CARRERAS, M. C.; LISDERO, C.; RIOBÓ, N.; SCHÖPFER, F.; BOVERIS, A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 328, n. 1, p. 85-92, 1996.

POOL, R. R. Difficulties in definition of equine osteochondrosis, differentiation of developmental and acquired lesions. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. S16, p. 5-12, 1993.

POOL, R. R. Traumatic injury and osteoarthritis. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint Disease in the Horse**. 1. ed. Philadelphia: Saunders, 1996. Cap 6, p. 87-104.

POOLE, A. R.; IONESCU, M.; SWAN, A.; DIEPPE, P. A. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. **Journal of clinical Investigation**, v. 94, n. 1, p. 25-33, 1994.

POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A.; CLAIBORNE, A. Protein sulfenic acids in redox signaling. **Annual Review of Pharmacology Toxicology**, 44, 325-347, 2004.

PREHM, P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. **The Biochemical Journal**, v. 220, n. 597-600, 1984.

PRESLE, N.; POTTIE, P.; DUMOND, H.; GUILLAUME, C.; LAPICQUE, F.; PALLU, S.; MAINARD, D.; NETTER, P.; TERLAIN, B. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 7, p. 690-695, 2006.

PRICE, J. S.; WATERS, J. G.; DARRAH, C.; PENNINGTON, C.; EDWARDS, D. R.; DONELL, S. T.; CLARK, I. M. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. **Aging cell**, v. 1, n. 1, p. 57-65, 2002.

PROVOT, S.; SCHIPANI, E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. **Biochemical and Biophysical Communications**, v. 328, n. 3, p. 658-665, 2005.

PULSATELLI, L.; ADDIMANDA, O.; BRUSI, V.; PAVLOSKA, B.; MELICONI, R. New findings in osteoarthritis pathogenesis: therapeutic implications. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 4, n. 1, p. 23-43, 2013.

QUINN, M. T.; GAUSS, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 4, p. 760-781, 2004.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; KOLTAI, E.; TAYLOR, A. W.; GOTO, S. Exercise, oxidative stress and hormesis. **Ageing research reviews**, v. 7, n.1, p. 34-42, 2008.

RADIN, E. L.; PAUL, I. L. A consolidated concept of joint lubrication. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 54, n. 3, p. 607-616, 1972.

RADIN, E. L.; ROSE, R. M. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. **Clinical Orthopaedic and Related Research**, n. 213, p. 34-40, 1986.

RAGAN, C. Viscosity of normal human synovial fluid. **Experimental Biology and Medicine**, v. 63, n.3, p. 572-575, 1946.

RAMAKRISHNAN, P. S.; BROUILLETTE, M. J.; MARTIN, J. A. Oxidative conditioning and treatment for Osteoarthritis. In ALCARAZ, M. J. (Ed.) **Studies on Arthritis and Joint Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice**. New York: Springer, 2013, cap. 17, p. 311- 332.

RAMAKRISHNAN, P.; HECHT, B. A.; PEDERSEN, D. R.; LAVERY, M. R.; MAYNARD, J.; BUCKWALTER, J. A.; MARTIN, J. A. Oxidant conditioning protects cartilage from mechanically induced damage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, n. 7, p. 914-920, 2010.

REED, S. R.; JACKSON, B. F.; MCILWRAITH, C. W.; WRIGHT, I. M.; PILSWORTH, R.; KNAPP, S.; WOOD, J. L. N.; PRICE, J. S.; VERHEYEN, K. L. P. Descriptive epidemiology of joint injuries in Thoroughbred racehorses in training. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-19, 2012.

REGAN, E. A.; BOWLER, R. P.; CRAPO, J. D. Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 4, p. 515-521, 2008.

REGAN, E.; FLANNELLY, J.; BOWLER, R.; TRAN, R.; NICKS, M.; CARBONE, B. D.; GLUECK, D.; HEIJNEN, H.; MASON, R.; CRAPO, J. Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 11, p. 3479-3491, 2005.

REILLY, P. M.; BULKLEY, G. B. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen. **British Journal of Surgery**, v. 77, n. 12, p. 1323-1324, 1990.

REJNÖ, S. Viscosity of equine synovial fluid. **Acta veterinaria Scandinavica**, v.17, n. 2, p. 169-177, 1975.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 357-363, 1994.

RICHARDSON, D. W.; DODGE, G. R. Effects of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 6, p. 624-630, 2000.

RICHETTE, P.; FRANÇOIS, M.; VICAUT, E.; FITTING, C.; BARDIN, T.; CORVOL, M.; SAVOURET, J. F.; RANNOU, F. A high interleukin 1 receptor antagonist/ IL-1 β ratio occurs naturally in knee osteoarthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 8, p. 150-1654, 2008.

RICHTER, C.; GOGVADZE, V.; LAFFRANCHI, R.; SCHLAPBACH, R.; SCHWEIZER, M.; SUTER, M.; WALTER, P.; YAFFEE, M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1271, n. 1, p. 67-74, 1995.

RICHTER, C.; KASS, G. E. Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. **Chemical-Biological Interactions**, v. 77, n. 1, p. 1-23, 1991.

RICHTER, C.; PARK, J. W.; AMES, B. N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 17, p. 6465-6467, 1988.

RIGGS, C. M. Osteochondral injury and joint disease in the athletic horse. **Equine Veterinary Education**, v. 18, n. 2, p. 100-112, 2006.

ROBERT, C.; VALETTE, J. P.; JACQUET, S.; LEPEULE, J.; DENOIX, J. M. Study design for the investigation of likely aetiological factors of juvenile osteochondral conditions (JOCC) in foals and yearlings. **The Veterinary Journal**, v.197, n. 1, p.36-43, 2013.

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, 1939.

ROPES, M. W.; ROSSMEISL, E. C.; BAUER, W. The origin and nature of normal human synovial fluid. **Journal of Clinical Investigation**, v. 19, n. 6, p. 795, 1940.

ROSS, A. D; BANDA, N. K.;MUGGLI, M.; AREND, W. P. Enhancement of collagen-induced arthritis in mice genetically deficient in extracellular superoxide dismutase. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 11, p. 3702-3711, 2004.

ROSSELAND, L. A.; KROHN, C. D.; STUBHAUG, A. Synovial fluid concentration of prostaglandin E2 correlates with pain intensity after knee arthroscopic procedures. **Anesthesia & Analgesia**, v. 104, n. 2, p. 460-461, 2007.

ROSSETTI, R. B.; MASSOCO, C. D. O.; PENNA, A. C. A.; SILVA, L. C. L. C. D. An experimental study to compare inflammatory response due to liquid or gas joint distension in horses submitted to arthroscopy. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 12, p. 848-854, 2012.

ROUGHLEY, P J. The structure and function of cartilage proteoglycans. **European Cells and Materials**, v. 12, p. 92-101, 2006.

ROWLEY, G.; ANTONAS, K. N.; HILBERT, B. J. Quantitation of hyaluronic acid in equine synovia. **American journal of veterinary research**, v.43, n. 6, p. 1096-1099, 1982.

RUGGIERO, P.; BOSSÙ, P.; MACCHIA, G.; DEL GROSSO, E.; SABBATINI, V.; BERTINI, R.; COLAGRANDE, R.; BIZZARRI, C.; MAURIZI, G.; DI CIOCCIO, V.; D'ANDREA, G.; DI GIULIO, A.; FRIGERIO, F.; GRIFANTINI, R.; GRANDI, G.; TAGLIABUE, A.; BORASCHI, D. Inhibitory activity of IL-1 receptor antagonist depends on the balance between binding capacity for IL-1 receptor type 1 and IL-1 receptor type II. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 8, p. 3881-3887, 1997.

RUTGERS, M.; SARIS, D. B.; DHERT, W. J.; CREEMERS, L. B. Research article Cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis, in vitro effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection. **Research and Arthritis Therapy**, v.12, p. R114, 2010.

SAARI, H. E. R. K. K. O.; KONTTINEN, Y. T. Determination of synovial fluid hyaluronate concentration and polymerisation by high performance liquid chromatography. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 48, n. 7, p. 565-570, 1989.

SAARI, H. Oxygen derived free radicals and synovial fluid hyaluronate. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 50, n. 6, p. 389-392, 1991.

SAARI, H.; KONTTINEN, Y. T.; FRIMAN, C.; SORSA, T. Differential effects of reactive oxygen species on native synovial fluid and purified human umbilical cord hyaluronate. **Inflammation**, v. 17, n. 4, p. 403-415, 1993.

SAITO, T.; TAKEUCHI, R.; MITSUHASHI, S.; UESUGI, M.; YOSHIDA, T.; KOSHINO, T. Use of joint fluid analysis for determining cartilage damage in osteonecrosis of the knee. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 7, p. 1813-1819, 2002.

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

SARAN, M.; BORS, W. Direct and indirect measurements of oxygen radicals. **Klinische Wochenschrift**, v. 69, n. 1, p. 957-964, 1991.

SARAN, M.; BORS, W. Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. **Free Radical Research**, v. 7, n. 3-6, p. 213-220, 1989.

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

SATO, M.; BREMNER, I. Oxygen free radicals and metallothionein. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 3, p. 325-337, 1993.

SAVAGE, C. J.; MCCARTHY, R. N.; JEFFCOTT, L. B. Effects of dietary phosphorus and calcium on induction of dyschondroplasia in foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. S16, p. 80-83, 1993a.

SAVAGE, C. J.; MCCARTHY, R. N.; JEFFCOTT, L. B. Effects of dietary energy and protein on induction of dyschondroplasia in foals. **Equine Veterinary Journal**, V. 25, n. S16, p. 74-79, 1993b.

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

SCANZELLO, C. R.; PLAAS, A.; CROW, M. K. Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound? **Current Opinion in Rheumatology**, v. 20, n. 5, p. 565-572, 2008.

SCANZELLO, C. R.; UMOH, E.; PESSLER, F.; DIAZ-TOME, C.; MILES, T.; DICARLO, E.; POTTER, H. G.; MANDI, L.; MARX, R.; RODEO, S.; GOLDRING, S. R.; CROW, M. K. Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, n. 8, p. 1040-1048, 2009.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

SCHENCK, R. C., GOODNIGHT, J. M. Current concept review – osteochondrosis dissecans. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 78, n. 3, p. 439-456, 1996.

SCHLAACK, 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 spondylarthropathies. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 14, n. 2, p. 155-162, 1996.

SCHNEIDER, N.; MOUTHYS-MICKALAD, A. L.; LEJEUNE, J. P.; DEBY-DUPONT, G. P.; HOEBEKE, M.; SERTEYN, D. A. Synoviocytes, not chondrocytes, release free radicals after cycles of anoxia/re-oxygenation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 334, n. 2, p. 669-673, 2005.

SCHUMACHER, H. R.; SIECK, M. S.; ROTHFUSS, S.; CLAYBURNE, G. M.; BAUMGARTEN, D. F.; MOCHAN, B. S.; KANT, J. A. Reproducibility of synovial fluid analyses. A study among four laboratories. **Arthritis and rheumatism**, v. 29, n. 6, p. 770-774, 1986.

SCHUMACHER, H.R. Synovial fluid analysis and synovial biopsy. In: FIRESTEIN, G. S.; BUDD, C. R.; GABRIEL, S. E.; MCINNES, I. B.; O'DELL, J.R. **Kelley Textbook of Rheumatology**, Philadelphia: WB Saunders, 1997, p. 609- 625.

SCOTECE, M.; CONDE, J.; GÓMEZ, R.; LÓPEZ, V.; LAGO, F.; GÓMEZ-REINO, J. J.; GUALILLO, O. Adipokines, Molecular Players at the Crossroad Between Inflammation and Oxidative Stress: Role in Arthropathies. In: ALCARAZ, M. J. (Ed.) **Studies on Arthritis and Joint Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice**. New York: Springer, 2013, cap.4, p. 67-88.

SCOTT, J. E. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. **FASEB Journal**, v. 6, n. 9, p. 2639-2645, 1992.

SCOTT, J. L.; GABRIELIDES, C.; DAVIDSON, R. K.; SWINGLER, T. E.; CLARK, I. M.; WALLIS, G. A.; BOOT-HANDFORD R. P.; TOM BL KIRKWOOD, T. B. L.; TALYOR, R. W.; YOUNG, D. A. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 8, p. 1502-1510, 2010.

SECKINGER, P.; KAUFMANN, M. T.; DAYER, J. M. An interleukin 11 inhibitor affects both cell-associated interleukin 1-induced T cell proliferation and PGE₂/collagenase production by human dermal fibroblasts and synovial cells. **Immunobiology**, v. 180, n. 4-5, p. 316-327, 1990.

SECKINGER, P.; YARON, I.; MEYER, F. A.; YARON, M.; DAYER, J. M. Modulation of the effects of interleukin-1 on glycosaminoglycans synthesis by the urine-derived interleukin-1 inhibitor, but not by interleukin-6. **Arthritis and Rheumatism**, v. 33, n. 12, p. 1807-1814, 1990.

SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 6, n. 11, p. 625-635, 2010.

SENDUR, O. F.; TURAN, Y.; TASTABAN, E.; SERTER, M. Antioxidant status in patients with osteoporosis: a controlled study. **Joint Bone Spine**, v. 76, n. 5, p. 514-518. 2009.

SHAH, R.; RASKA, K.; TIKU, M. L. The presence of molecular markers of in vivo lipid peroxidation in osteoarthritic cartilage: a pathogenic role in osteoarthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 52, n. 9, p. 2799-2807, 2005.

SHANE ANDERSON, A.; LOESER, R. Why is osteoarthritis an age-related disease? **Best Practice and Research. Clinical Rheumatology**, v. 24, n. 1, p. 15-26, 2010.

SHAPIRO, F. Epiphyseal and physeal cartilage vascularization: a light microscopic and tritiated thymidine autoradiographic study of cartilage canals in newborn and young postnatal rabbit bone. **The Anatomical Record**, v. 252, n. 1, p. 140-148, 1998.

SHARIF, M.; OSBORNE, D. J.; MEADOWS, K.; WOODHOUSE, S. M.; COLVIN, E. M.; SHEPSTONE, L.; DIEPPE, P. A. The relevance of chondroitin and keratan sulphate markers in normal and arthritic synovial fluid. **Rheumatology**, v. 35, n. 10, p. 951-957, 1996.

SHAW, M.; COHEN, P.; ALESSI, D. R. The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. **The Biochemical Journal**, v. 336, p. 241-246, 1998. Part 1.

SHINGLETON, W. D.; MACKIE, E. J.; CAWSTON, T. E.; JEFFCOTT, L. B. Cartilage canals in equine articular/epiphyseal growth cartilage and a possible association with dyschondroplasia. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 5, p. 360-364, 1997.

SHMERLING, R. H. Synovial fluid analysis. A critical reappraisal. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v.20, n.2, p. 503-512, 1994.

SIBLEY, J. T.; HARTH, M.; BURNS, D. E. The mucin clot test and the synovial fluid rheumatoid factor as diagnostic criteria in rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v.10, n.6, p 889-893, 1983.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3,p. S31-S38, 1991a.

SIES, H. Role of reactive oxygen species in biological processes. **Klinische Wochenschrift**, v. 69, n. 21-23,p. 965-968, 1991b.

SITUNAYAKE, R. D.;THURNHAM, D. I.; KOOTATHEP, S.; CHIRICO, S.; LUNEC, J.; DAVIS, M.; MCCONKEY, B. Chain breaking antioxidant status in rheumatoid arthritis: clinical and laboratory correlates. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 50, n. 2, p. 81-86, 1991

SJÖBERG, A.; ONNERFJORD, P.; MÖRGELIN, M.; HEINEGÅRD, D.; BLOM, A. M. The extracellular matrix and inflammation: fibromodulin activates the classical pathway of complement by directly binding C1q. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 37, p.32301-32308, 2005.

SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTE; MOL, J. A.; BARNEVELD, A. Hormones, growth factors and other plasma variables in relation to osteochondrosis. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, p. 45-54, 1999. Supplement.

SOFFLER, C. Oxidative stress. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 23, n. 1, p. 135-157, 2007.

SOHAL, R. S.; ALLEN, R. G. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. **Experimental Gerontology**, v. 25, n. 6, p. 499-522, 1990.

SOKOLOVE, J.; LEPUS, C. M. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 5, n. 2, p. 77-94, 2013.

ŠOLTÉS, L.; MENDICHI, R.; KOGAN, G.; SCHILLER, J.; STANKOVSKA, M.; ARNHOLD, J. (2006). Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, p. 659-668, 2006.

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

STEFANOVIC-RACIC, M.; STADLER, J.; GEORGESCU, H. I.; EVANS, C. H. Nitric oxide and energy production in articular chondrocytes. **Journal of cellular physiology**, v. 159, n. 2, p. 274-280, 1994.

STUDER, R. K.; LEVICOFF, E.; GEORGESCU, H.; MILLER, L.; JAFFURS, D.; EVANS, C. H. Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IGF-I: inhibition of IGF-IR β tyrosine phosphorylation. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 279, n. 4, p. C961-C969, 2000.

SUMII, H.; INOUE, H.; ONOUE, J.; MORI, A.; ODA, T.; TSUBOKURA, T. Superoxide dismutase activity in arthropathy: its role and measurement in the joints. **Hiroshima journal of medical sciences**, v. 45, n. 2, p. 51-55, 1996.

SUN, Y. I.; OBERLEY, L. W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 4497-500, 1988.

SUNDMAN, E. A.; COLE, B. J.; FORTIER, L. A. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. **The American journal of sports medicine**, v. 39, n. 10, p. 2135-2140, 2011.C

SURI, S.; WALSH, D. A. Osteochondral alterations in osteoarthritis. **Bone**, v. 51, n. 2, p. 204-211, 2012.

SUTIPORNPALANGKUL, W., MORALES, N. P., CHAROENCHOLVANICH, K., & HARNROONGROJ, T. Lipid peroxidation, glutathione, vitamin E, and antioxidant enzymes in synovial fluid from patients with osteoarthritis. **International journal of rheumatic diseases**, v. 12, n. 4, p. 324-328, 2009.

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

SUZUKI, Y. J.; FORMAN, H. J.; SEVANIAN, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 1-2, p. 269-285, 1997.

SWAN, A.; AMER, H.; DIEPPE, P. The value of synovial fluid assays in the diagnosis of joint disease: a literature survey. **Annals of the rheumatic diseases**, v.61, n.6, p.493-498, 2002.

SWANN, D. A.; SILVER, F. H.; SLAYTER, H. S.; STAFFORD, W.; SHORE, E. The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. **The Biochemical Journal**, v. 225, p. 195-201, 1985.

TALJANOVIC, M.; GRAHAM, A. R.; BENJAMIN, J. B.; GMTRO, A. F.; KRUPINSKI, E. A.; SCHWARTZ, S. A.; HUNTER, T. B.; RESNICK, D. L. Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology. **Skeletal Radiology**, V. 37, N. 5, P. 423-431, 2008.

TAYLOR, L., MENCONI, M. J., POLGAR, P. The participation of hydroperoxides and oxygen radicals in the control of prostaglandin synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n.11, p. 6855-6857, 1983

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

TCHETINA, E. V.; DI BATTISTA, J. A.; ZUKOR, D. J.; ANTONIOU, J.; POOLE, A. R. Prostaglandin PGE. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, p. [R75], n. 4, 2007.

TERKELTAUB, R.; JOHNSON, K.; MURPHY, A.; GHOSH, S. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. **Mitochondrion**, v. 1, n. 4, p. 301-319, 2002.

TERLAIN, B.; DUMOND, H.; PRESLE, N.; MAINARD, D.; BIANCHI, A.; LOEUILLE, D.; NATTER, P.; POTTIE, P. La leptine est-elle le maillon manquant entre l'arthrose et l'obésité? **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 63, n. 3, p. 186-193, 2005.

TEW, W. P., & HOTCHKISS, R. N. Synovial fluid analysis and equine joint disorders. **Journal of equine veterinary science**, v. 1, n. 5, p. 163-170. 1981.

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

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

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

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

THOR, H., MIRABELLI, F., SALIS, A., COHEN, G. M., BELLOMO, G., & ORRENIUS, S. Alterations in hepatocyte cytoskeleton caused by redox cycling and alkylating quinones. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 266, n. 2, p.397-407, 1988.

TIKU, M. L.; ALLISON, G. T.; NAIK, K.; KARRY, S. K. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 11, n. 3, p. 159-166, 2003.

TIKU, M. L.; GUPTA, S.; DESHMUKH, D. R. Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. **Free radical research**, v. 30, n. 5, p. 395-405, 1999.

TIKU, M. L.; LIESCH, J. B.; ROBERTSON, F. M. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 2, p. 690-696, 1990.

TIKU, M. L.; SHAH, R.; ALLISON, G. T. Evidence Linking Chondrocyte Lipid Peroxidation to Cartilage Matrix Protein Degradation POSSIBLE ROLE IN CARTILAGE AGING AND THE PATHOGENESIS OF OSTEOARTHRITIS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 26, p. 20069-20076, 2000.

TIKU, M. L.; YAN, Y. P.; CHEN, K. Y. Hydroxyl radical formation in chondrocytes and cartilage as detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy using spin trapping reagents. **Free radical research**, v. 29, n. 3, p. 177-187, 1998.

TOBIN, T.; CHAY, S.; KAMERLING, S.; WOODS, W. E.; WECKMAN, T. J.; BLAKE, J. W.; LEES, P. Phenylbutazone in the horse: a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and therapeutics**, v. 9, n. 1, p. 1-25, 1986.

TOCHIGI, Y.; BUCKWALTER, J. A.; MARTIN, J. A.; HILLIS, S. L.; ZHANG, P.; VASEENON, T.; LEHMAN, A. D.; BROWN, T. D. Distribution and progression of chondrocyte damage in a whole-organ model of human ankle intra-articular fracture. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 93, n. 6, p. 533-539, 2011.

TOMIYAMA, T.; FUKUDA, K.; YAMAZAKI, K.; HASHIMOTO, K.; UEDA, H.; MORI, S.; HAMANISHI, C. Cyclic compression loaded on cartilage explants enhances the production of reactive oxygen species. **The Journal of rheumatology**, v. 34, n. 3, p. 556-562, 2007.

TORTORELLA, M. D.; BURN, T. C.; PRATTA, M. A.; ABBASZADE, I.; HOLLIS, J. M.; LIU, R.; ROSENFELD, S. A.; COPELAND, R. A.; DECICCO, C. P.; WYNN, R.; ROCKWELL, A.; YANG, F.; DUKE, J. L.; SOLOMON, K.; GEORGE, H.; BRUCKNER, R.; NAGASE, H.; ITOH, Y.; ELLIS, D. M.; ROSS, H.; WISWALL, B. H.; MURPHY, K.; HILLMAN Jr, M. C.; HOLLIS, G. F.; NEWTON, R. C.; MAGOLDA, R. L.; TRZASKOS, J. M.; ARNER, E. C. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1664-1666, 1999.

TOUSSAINT, O.; DUMONT, P.; DIERICK, J. F.; PASCAL, T.; FRIPPIAT, C.; CHAINIAUX, F.; SLUSE, F.; ELIAERS, F.; REMACLE, J. Stress-induced premature senescence: essence of life, evolution, stress, and aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, p. 85-98, 2000.

TOUSSAINT, O.; MEDRANO, E. E.; VON ZGLINICKI, T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. **Experimental Gerontology**, v. 35, n. 8, p. 927-945, 2000.

TRACY BALLOCK, R.; O'KEEFE, R. J. Physiology and pathophysiology of the growth plate. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 69, n. 2, p. 123-143, 2003.

TRIFUNOVIC, A.; HANSSON, A.; WREDENBERG, A.; ROVIO, A. T.; DUFOUR, E.; KHVOROSTOV, I.; JOHANNES, N.; SPELBRINK, J.N.; WIBOM, R.; JACOBS, H. T.; LARSSON, N. G. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 50, p. 17993-17998, 2005.

TROTTER, G. W.; MCILWRAITH, C. W. Clinical features and diagnosis of equine joint disease. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia, WB Saunders, 1996; cap.8, p.120-145.

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 arthritides. **American journal of veterinary research**, v. 57, n.6, p. 932-937, 1996.

TUNG, J. T.; ARNOLD, C. E.; ALEXANDER, L. H.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; VENTA, P. J.; RICHARDSON, D. W.; CARON, J. P. Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin-1 β -stimulated matrix metalloproteinases 1, 3, and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. **American journal of veterinary research**, v. 63, n. 7, p. 987-993, 2002.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience reports**, v. 17, n. 1, p. 3-8, 1997.

UMEKI, S. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human neutrophil NADPH oxidase in both whole cell and cell-free systems. **Biochemical pharmacology**, v. 40, n.3, p. 559-564, 1990.

URBAN, J. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. **The Biochemical Journal**, v. 321, p. 95-102, 1997.

VALENTINO, L. W.; LILLICH, J. D.; GAUGHAN, E. M.; BILLER, D. R.; RAUB, R. H. Radiographic prevalence of osteochondrosis in yearling feral horses. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 12, p. 151-155, 1999.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN DE LEST, C. H. A.; BRAMA, P. A. J.; VAN EL, B.; DEGROOT, J.; VAN WEEREN, P. R. Extracellular matrix changes in early osteochondrotic defects in foals: a key role for collagen? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1690, n. 1, p. 54-62, 2004.

VAN DER HARST, M.; BULL, S.; BRAMA, P. A.; BARNEVELD, A. B.; VAN WEEREN, P. R.; VAN DE LEST, C. Nitrite and nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subchondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult, and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joints. **The Journal of rheumatology**, v. 33, n. 8, p. 1662-1667, 2006.

VAN DER KRAAN, P. M.; BLANEY DAVIDSON, E. N.; VAN DEN BERG, W. B. Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: to serve and protect or a wolf in sheep clothing's? **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 6, p. 735-741, 2010.

VAN DER KRAAN, P. M.; VAN DEN BERG, W. B. Osteophytes: relevance and biology. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 3, p. 237-244, 2007.

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

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

VAN WEEREN, P. R., BARNEVELD, A. The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal. **Equine Veterinary Journal**, p. 9-15, 1999, Supplement, 31.

VAN WEEREN, P. R. Etiology, diagnosis, and treatment of OC(D). **Equine Practice**, v. 5, p. 248-258, 2006.

VAN WEEREN, P. R. Etiology, diagnosis, and treatment of OC(D). **Equine Practice**, v. 5, p. 248-258, 2006.

VAN WEEREN, P. R. History of locomotor research. In: BACK, W.; CLAYTON, H. **Equine locomotion**. 1. ed. [S.I.]: Saunders, 2001. cap 1, p. 1-35.

VAN WEEREN, P. R.; BRAMA, P. A. J. Equine joint disease in the light of new developments in articular cartilage research. **Pferdeheilkunde**, v. 19, n. 4, p. 336-344, 2003.

VAN WEEREN, P. R.; DENOIX, J. M. The Normandy field study on juvenile osteochondral conditions: conclusions regarding the influence of genetics, environmental conditions and management, and the effect on performance. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 1, p. 90-95, 2013.

VAN WEEREN, P. R.; FIRTH, E. C.; BROMMER, H.; HYTTINEN, M. M.; HELMINEN, A. E.; ROGERS, C. W.; DEGROOT, J.; BRAMA, P. A. Early exercise advances the maturation of glycosaminoglycans and collagen in the extracellular matrix of articular cartilage in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 2, p. 128-135, 2008.

VAN WEEREN, P. R.; JEFFCOTT, L. B. Problems and pointers in osteochondrosis: twenty years on. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 1, p. 96-102, 2013.

VENKATASUBRAMANIAN, K.; JOSEPH, K. T. Action of singlet oxygen on collagen. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v.14, n. 3, p.217, 1977.

VILLASANTE, A.; ARANEDA, O. F.; BEHN, C.; GALLEGUILLOS, M.; ADARMES, H. Antioxidant capacity and oxidative damage determination in synovial fluid of chronically damaged equine metacarpophalangeal joint. **Veterinary research communications**, v. 34, n. 2, p. 133-141, 2010.

VISCO, D. M.; HILL, M. A.; VAN SICKLE, D. C.; KINCAID, S. A. The development of centres of ossification of bones forming elbow joints in young swine. **Journal of Anatomy**, v. 171, p. 25-39, 1990.

VOEHRINGER, D. W.; HIRSCHBERG, D. L.; XIAO, J.; LU, Q.; ROEDERER, M.; LOCK, C. B.; HERZENBERG, L. A.; STEINMAN, L.; HERZENBERG, L. A. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 6, p. 2680-2685, 2000.

VON ZGLINICKI, T. Oxidative stress shortens telomeres. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 7, p. 339-344, 2002.

VON ZGLINICKI, T.; SARETZKI, G.; DÖCKE, W.; LOTZE, C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? **Experimental Cell Research**, v. 220, n. 1, p. 186-193, 1995.

VOUTE, L. C.; HENSON, F. M. D.; PLATT, D.; JEFFCOTT, L. B. Osteochondrosis lesions of the lateral trochlear ridge of the distal femur in four ponies. **Veterinary Record**, v. 168, n. 10: 265, 2011.

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

WANG, Q.; ROZELLE, A. L.; LEPUS, C. M.; SCANZELLO, C. R.; SONG, J. J.; LARSEN, D. M.; CRISH, J. F.; BEBEK, G.; RITTER, S. Y.; LINDSTROM, T. M.; HWANG, I.; WONG, H. H.; PUNZI, L.; ENCARNACION, A.; SHAMLOO, M.; GOODMAN, S. B.; WYSS-CORAY, T.; GOLDRING, S. R.; BANDA, N. K.; THURMAN, J. M.; GOBEZIE, R.; CROW, M. K.; HOLERS, V. M.; LEE, D. M.; ROBINSON, W. H. Identification of central role for complement in osteoarthritis. **Nature Medicine**, v. 17, n. 12, p. 1674-1679, 2011.

WAUQUIER, F.; LEOTOING, L.; COXAM, V.; GUICHEUX, J.; WITTRANT, Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 10, p. 468-477, 2009.

WEGLARZ L.; DRÖZDZ M.; GOSS M. Effect of anti-inflammatory drugs on the activity of antioxidant enzymes and *in vivo* peroxidation products in the liver and kidney of the rat. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 96C, n. 1, p 83-85, 1990.

WEHLING, P.; MOSER, C.; FRISBIE, D.; MCILWRAITH, C. W.; KAWCAK, C. E.; KRAUSPE, R.; REINECKE, J. A. Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases. **BioDrugs**, v. 21, n. 5, p. 323-332, 2007.

WEINBERGER, T. Klinische Erfahrungen mit der Anwendung von ACS/ORTHOKIN/IRAP beim Pferd. **Pferdespiegel**, v. 11, p. 111-114, 2008.

WESTACOTT; C. I.; WEBB, G. R.; WARNOCK, M. G.; SIMS, J. V.; ELSON, C. J. Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, n. 7, p. 1282-1291, 1997.

WIENTJES, F. B.; SEGAL, A. W. NADPH oxidase and the respiratory burst. **Seminars in cell biology**, v. 6, n. 6, p. 357-365, 1995.

WILSMAN, N.; VAN SICKLE, D. C. Cartilage canals, their morphology and distribution. **The Anatomical Record**, v. 173, n. 1, p. 79-93, 1972.

WILSMAN, N.; VAN SICKLE, D. C. The relationship of cartilage canals to the initial osteogenesis of secondary centers of ossification. **The Anatomical Record**, v. 168, n. 3, p. 381-391, 1970.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.

WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 8, p. 2145-2154, 1991.

WONG, M.; CARTER, D. R. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. **Bone**, v. 33, n. 1, p. 1-13, 2003.

YAMAGUCHI, T.; HAYASHI, K.; TAYAMA, N.; SUGIOKA, Y. The role of cartilage canals: experimental study using rabbit's femoral heads. **Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi**, v. 64, n. 11, p. 1105-1110, 1990.

YAMAZAKI, K.; FUKUDA, K.; MATSUKAWA, M.; HARA, F.; MATSUSHITA, T.; YAMAMOTO, N.; YOSHIDA, K.; MUNAKATA, H.; HAMANISHI, C. Cyclic tensile stretch loaded on bovine chondrocytes causes depolymerization of hyaluronan: involvement of reactive oxygen species. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 11, p. 3151-3158, 2003.

YELLIN, M. J.; WINIKOFF, S.; FORTUNE, S. M.; BAUM, D.; CROW, M. K.; LEDERMAN, S.; CHESS, L. Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation. **Journal of leukocyte biology**, v. 58, n. 2, p. 209-216, 1995.

YIM, M. B.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 13, p. 5006-5010, 1990.

YIM, M. B.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 6, p. 4099-4105, 1993.

YIN, W.; PARK, J. I.; LOESER, R. F. Oxidative stress inhibits insulin-like growth factor-I induction of chondrocyte proteoglycan synthesis through differential regulation of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and MEK-ERK MAPK signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 46, p. 31972-31981, 2009.

YOSHIHIKO, Ō. Inhibition of superoxide anion production in macrophages by anti-inflammatory drugs. **Biochemical pharmacology**, v. 25, n.13, p. 1473-1480, 1976.

YSART, G. E.; MASON, R. M. Responses of articular cartilage explant cultures to different oxygen tensions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1221, n. 1, p.15-20, 1994.

YTREHUS, B.; ANDREAS HAGA, H.; MELLUM, C. N.; MATHISEN, L.; CARLSON, C. S.; EKMAN, S.; TEIGE, J.; REINHOLT, F. P. Experimental ischemia of porcine growth cartilage produces lesions of osteochondrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, n. 6, p. 1201-1209, 2004a.

YTREHUS, B.; CARLSON, C. S.; EKMAN, S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 4, p. 429-448, 2007.

YTREHUS, B.; EKMAN, S.; CARLSON, C. S.; TEIGE, J.; REINHOLT, F. P. Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. **Bone**, v. 35, n. 6, p. 1294-1306, 2004b.

YUDOH, K.; VAN TRIEU, N.; NAKAMURA, H.; HONGO-MASUKO, K.; KATO, T.; NISHIOKA, K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. **Arthritis research & therapy**, v. 7, n. 2, p. R380, 2005.

ZHANG, X.; MAO, Z.; YU, C. Suppression of early experimental osteoarthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, n. 4, p. 742-750, 2004.

ZHANG, Y.; MARCILLAT, O.; GIULIVI, C.; ERNSTER, L.; DAVIES, K. J. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 27, p. 16330-16336, 1990.

ZHOU, S.; CUI, Z.; URBAN, J. P. Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage–bone interface: a modeling study. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 12, p. 3915-3924, 2004.

ZHOU, Y.; LIN, G.; MURTAUGH, M. P. Interleukin-4 suppresses the expression of macrophage NADPH oxidase heavy chain subunit (gp91-phox). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1265, n. 1, p. 40-48, 1995.

ZISKOVEN, C.; JÄGER, M.; KIRCHER, J.; PATZER, T.; BLOCH, W.; BRIXIUS, K.; KRAUSPE, R. Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 89, n. 7, p. 455-466, 2011.

ZISKOVEN, C.; JÄGER, M.; ZILKENS, C.; BLOCH, W.; BRIXIUS, K.; KRAUSPE, R. Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation? **Orthopedic reviews**, v. 2, n. 2, p. 95-101, 2010.

APÊNDICE A

Tabela 1 - Atividade média e erro padrão da Catalase (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	**	3,94
COA 2	A2	0,11	2,75
COA 2	A3	0,67	0,86
COA 3	A4	***	3,94
COA 4	A5	0,92	3,94
COA 5	A6	**	2,92
COA 6	A7	0,62	3,94
COA 6	A8	0,70	3,94
MÉDIA		0,61a	3,28b
EP		0,13	0,49

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

** *Outlier*

*** Níveis não detectados na amostra

Tabela 2- Atividade média e erro padrão de Catalase (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	**	3,94
POA 2	A10	0,42	3,94
POA 3	A11	0,15	3,94
POA 4	A12	1,69	1,85
POA 5	A13	3,23	3,79
POA 5	A14	3,94	1,94
POA 6	A15	3,94	3,94
POA 6	A16	0,41	3,15
POA 6	A17	3,90	3,26
MÉDIA		2,21a	3,31b
EP		0,61	0,28

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

** *Outlier*

Tabela 3- Atividade média e erro padrão de Catalase (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	1,83	3,22
COC 2	A19	0,22	3,32
COC 3	A20	0,66	1,94
COC 3	A21	**	3,94
COC 3	A22	0,30	0,98
COC 4	A23	0,56	3,94
COC 5	A24	**	1,14
COC 6	A25	1,40	3,94
MÉDIA		0,83a	2,80b
EP		0,26	0,45

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

** *Outlier*

Tabela 4 -Atividade média e erro padrão de Catalase (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	0,24	0,84
POC 1	A26	0,43	1,12
POC 2	A27	1,66	0,67
POC 3	A28	1,36	3,92
POC 3	A29	0,17	3,94
POC 4	A30	0,88	3,94
POC 4	A31	0,77	1,58
POC 5	A32	0,53	3,94
POC 5	A33	0,39	3,54
POC 5	A34	0,89	2,97
POC 6	A35	0,53	3,94
POC 6	A36	**	3,94
MÉDIA		0,71a	2,86b
EP		0,14	0,40

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

** *Outlier*

Tabela 5 - Comparação da atividade da catalase (nmol/min/mL) no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo - 2013

	OCD	OA
	1,83	0,11
	0,22	0,67
	0,66	0,92
	0,3	0,62
	0,56	0,7
	1,4	0,42
	0,24	0,15
	0,43	1,69
	1,66	3,23
	1,36	3,94
	0,17	3,94
	0,88	
	0,77	
	0,53	
	0,39	
	0,89	
MÉDIA	0,75a	1,49b
EP	0,13	0,52

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

APÊNDICE B

Tabela 6 - Concentração média e erro padrão de SOD/Ureia (U/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	0,20	0,95
COA 2	A2	0,18	0,15
COA 2	A3	0,19	*
COA 3	A4	***	0,60
COA 4	A5	0,42	0,77
COA 5	A6	0,33	0,44
COA 6	A7	0,34	0,41
COA 6	A8	0,30	0,20
MÉDIA		0,28	0,50
EP		0,035	0,110

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

*** Níveis não detectados na amostra

Tabela 7 - Concentração média e erro padrão de SOD/Ureia (U/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma processado autólogo (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	***	***
POA 2	A10	0,12	0,26
POA 3	A11	0,15	0,44
POA 4	A12	0,42	0,34
POA 5	A13	0,21	0,24
POA 5	A14	0,36	0,14
POA 6	A15	0,76	1,20
POA 6	A16	0,52	0,45
POA 6	A17	0,42	2,51
MÉDIA		0,37	0,70
EP		0,07	0,28

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*** Níveis não detectados na amostra

Tabela 8 - Concentração média e erro padrão de SOD/Ureia (U/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	0,45	0,96
COC 2	A19	0,22	0,32
COC 3	A20	0,16	0,22
COC 3	A21	0,28	0,74
COC 3	A22	0,35	0,17
COC 4	A23	0,64	1,00
COC 5	A24	0,30	*
COC 6	A25	0,54	***
MÉDIA		0,37	0,57
EP		0,06	0,15

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

*** Níveis não detectados na amostra

Tabela 9 - Concentração média e erro padrão de SOD/Ureia (U/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	1,05	1,67
POC 1	A26	0,22	0,96
POC 2	A27	0,17	0,17
POC 3	A28	0,48	0,51
POC 3	A29	0,53	0,00
POC 4	A30	0,47	0,37
POC 4	A31	0,21	0,08
POC 5	A32	0,30	0,00
POC 5	A33	0,24	0,29
POC 5	A34	*	*
POC 6	A35	0,73	1,12
POC 6	A36	0,36	0,49
MÉDIA		0,43	0,51
EP		0,08	0,16

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 10 - Concentração da SOD/Ureia (U/mg) no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo - 2013

	OCD	OA
	0,45	0,19
	0,22	0,18
	0,16	0,19
	0,28	0,42
	0,35	0,33
	0,64	0,34
	0,30	0,30
	0,54	0,12
	1,05	0,15
	0,22	0,42
	0,17	0,21
	0,48	0,36
	0,53	0,76
	0,47	0,52
	0,21	0,42
	0,30	
	0,24	
	0,73	
	0,36	
MÉDIA	0,40	0,33
EP	0,05	0,04

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

APÊNDICE C

Tabela 11- Atividade média e erro padrão de GPX (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	ND	655,67
COA 2	A2	83,74	261,24
COA 2	A3	***	***
COA 3	A4	***	83,20
COA 4	A5	216,81	2042,89
COA 5	A6	168,56	316,27
COA 6	A7	335,85	438,37
COA 6	A8	231,41	265,35
MÉDIA		207,28	580,43
EP		41,21	233,99

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*** Níveis não detectados na amostra

Tabela 12- Atividade média e erro padrão de GPX (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma processado autólogo (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	***	189,90
POA 2	A10	***	219,46
POA 3	A11	145,49	164,68
POA 4	A12	277,28	372,83
POA 5	A13	339,95	306,60
POA 5	A14	588,18	419,97
POA 6	A15	207,17	475,36
POA 6	A16	281,33	331,24
POA 6	A17	305,20	371,04
MÉDIA		306,37	316,79
EP		52,95	35,53

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*** Níveis não detectados na amostra

Tabela 13- Atividade média e erro padrão de GPX (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	103,96	215,40
COC 2	A19	49,24	228,53
COC 3	A20	8,92	227,54
COC 3	A21	178,42	479,77
COC 3	A22	***	354,11
COC 4	A23	91,20	379,28
COC 5	A24	134,44	116,75
COC 6	A25	178,38	617,10
MÉDIA		106,37	327,31
EP		23,98	57,82

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

***Níveis não detectados na amostra

Tabela 14- Atividade média e erro padrão de GPX (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	91,39	148,11
POC 1	A26	40,27	259,91
POC 2	A27	2,34	199,51
POC 3	A28	***	295,97
POC 3	A29	***	261,24
POC 4	A30	***	217,05
POC 4	A31	***	197,67
POC 5	A32	62,74	514,88
POC 5	A33	***	274,23
POC 5	A34	228,44	323,94
POC 6	A35	***	192,17
POC 6	A36	***	105,87
MÉDIA		85,04	249,21
EP		38,69	30,08

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*** Níveis não detectados na amostra

Tabela 15 - Atividade média e erro padrão de GPX (nmol/min/mL) presente no líquido sinovial da OCD e na OA no momento 0 horas- São Paulo- 2013

	OCD	OA
	103,96	91,39
	49,24	40,27
	8,92	2,34
	178,42	62,74
	91,2	228,44
	134,44	145,49
	178,38	277,28
	83,74	339,95
	216,81	588,18
	168,56	207,17
	335,85	281,33
	231,41	305,2
MÉDIA	118,73	122,37
EP	25,88	35,40

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

APÊNDICE D

Tabela 16- Concentração média e erro padrão de TAC/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	2,81	0,90
COA 2	A2	2,57	2,65
COA 2	A3	2,14	0,12
COA 3	A4	***	***
COA 4	A5	0,86	2,09
COA 5	A6	0,49	1,13
COA 6	A7	0,38	0,98
COA 6	A8	0,24	0,70
MÉDIA		1,36	1,22
EP		0,42	0,33

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*** Níveis não detectados na amostra

Tabela – 17 Concentração média e erro padrão de TAC/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma processado autólogo (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	***	***
POA 2	A10	0,89	0,31
POA 3	A11	1,20	1,18
POA 4	A12	4,02	2,39
POA 5	A13	1,08	0,65
POA 5	A14	0,79	3,86
POA 6	A15	2,74	8,72
POA 6	A16	5,15	8,92
POA 6	A17	3,65	3,72
MÉDIA		2,44	3,72
EP		0,60	1,21

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*** Níveis não detectados na amostra

Tabela 18 - Concentração média e erro padrão de TAC/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 201

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	3,38	1,88
COC 2	A19	1,30	0,68
COC 3	A20	1,33	1,60
COC 3	A21	1,91	3,68
COC 3	A22	1,57	1,55
COC 4	A23	2,74	2,31
COC 5	A24	1,54	*
COC 6	A25	4,18	1,37
MÉDIA		2,24	1,87
EP		0,38	0,36

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 19 - Concentração média e erro padrão de TAC/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	3,75	2,72
POC 1	A26	3,03	2,70
POC 2	A27	2,33	2,34
POC 3	A28	1,87	1,28
POC 3	A29	1,45	1,03
POC 4	A30	4,82	2,26
POC 4	A31	4,08	1,97
POC 5	A32	1,84	1,08
POC 5	A33	1,13	4,11
POC 5	A34	*	*
POC 6	A35	3,61	4,22
POC 6	A36	1,27	7,12
MÉDIA		2,65	2,80
EP		0,38	0,54

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 20 - Concentração média e erro padrão de TAC/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo- 2013

	OCD	OA
	3,38	2,81
	1,3	2,57
	1,33	2,14
	1,91	0,86
	1,57	0,49
	2,74	0,38
	1,54	0,24
	4,18	0,89
	3,75	1,2
	3,03	4,02
	2,33	1,08
	1,87	0,79
	1,45	2,74
	4,82	5,15
	4,08	3,65
	1,84	2,49
	1,13	
	3,61	
	1,27	
MÉDIA	2,48	1,97
EP	0,27	0,36

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

APÊNDICE E

Tabela 21 - Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	9913,58	8320,51
COA 2	A2	7583,13	14573,02
COA 2	A3	8519,03	*
COA 3	A4	***	17706,14
COA 4	A5	***	67087,41
COA 5	A6	4508,37	27106,70
COA 6	A7	15105,32	15668,64
COA 6	A8	***	23248,46
MÉDIA		9125,89	24815,84
EP		1738,45	7409,49

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

*** Níveis não detectados na amostra

Tabela 22 - Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma processado autólogo (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	*	*
POA 2	A10	10569,81	11053,12
POA 3	A11	3772,36	7216,62
POA 4	A12	14488,07	19108,43
POA 5	A13	12173,33	21313,59
POA 5	A14	10296,04	23301,90
POA 6	A15	9770,56	29652,69
POA 6	A16	8654,02	19839,98
POA 6	A17	9553,66	20500,60
MÉDIA		9909,73a	18998,37b
EP		1086,12	2472,38

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 23 - Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	4986,33	5863,12
COC 2	A19	1512,26	3892,11
COC 3	A20	1944,90	4767,01
COC 3	A21	1530,15	6559,69
COC 3	A22	2349,14	6394,90
COC 4	A23	5821,71	27431,32
COC 5	A24	10716,62	*
COC 6	A25	6402,79	10639,20
MÉDIA		4407,99	9363,91
EP		1142,40	3117,02

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 24 - Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo condicionado (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	12289,08	25676,58
POC 1	A26	6882,26	16032,50
POC 2	A27	6162,79	22067,39
POC 3	A28	4875,99	5913,33
POC 3	A29	6993,87	10836,75
POC 4	A30	7523,86	5151,29
POC 4	A31	5430,70	6841,51
POC 5	A32	10327,83	44300,34
POC 5	A33	8324,63	7738,45
POC 5	A34	*	*
POC 6	A35	3071,43	14109,36
POC 6	A36	2957,73	11515,81
MÉDIA		6803,65a	15471,21b
EP		853,42	3503,49

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 25 - Concentração média e erro padrão de CEHC/Ureia (ng/mg) presente no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo - 2013

	OCD	OA
	1446033,36	9913,58
	1512,26	7583,13
	1944,9	8519,03
	1530,15	4508,37
	2349,14	15105,32
	5821,71	10569,81
	10716,62	3772,36
	6402,79	14488,07
	12289,08	12173,33
	6882,26	10296,04
	6162,79	9770,56
	4875,99	8654,02
	6993,87	9553,66
	7523,86	
	5430,7	
	10327,83	
	8324,63	
	3071,43	
	2957,73	
MÉDIA	5532,59 a	9608,25b
EP	786,18	907,22

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$

APÊNDICE F

Tabela 26 - Concentração média e erro padrão de Proteína Carbonil/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	17,86	-13,78
COA 2	A2	9,47	13,67
COA 2	A3	*	*
COA 3	A4	*	*
COA 4	A5	9,75	24,31
COA 5	A6	1,78	-1,51
COA 6	A7	5,14	15,66
COA 6	A8	5,76	7,22
MÉDIA		8,29	7,60
EP		2,26	5,54

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 27 - Concentração média e erro padrão de Proteína Carbonil/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma processado autólogo (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	*	*
POA 2	A10	*	*
POA 3	A11	*	*
POA 4	A12	20,09	24,88
POA 5	A13	2,05	11,91
POA 5	A14	1,08	9,44
POA 6	A15	*	*
POA 6	A16	14,34	29,71
POA 6	A17	12,38	12,42
MÉDIA		9,99a	17,67b
EP		3,67	4,03

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 28 - Concentração média e erro padrão de Proteína Carbonil/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	11,02	8,79
COC 2	A19	4,23	8,48
COC 3	A20	7,27	-1,29
COC 3	A21	13,92	20,47
COC 3	A22	*	*
COC 4	A23	15,79	10,57
COC 5	A24	*	*
COC 6	A25	12,30	-0,99
MÉDIA		10,76	7,67
EP		1,76	3,31

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 29 - Concentração média e erro padrão de Proteína Carbonil/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	*	*
POC 1	A26	*	*
POC 2	A27	4,90	21,48
POC 3	A28	*	*
POC 3	A29	*	*
POC 4	A30	*	*
POC 4	A31	15,46	9,80
POC 5	A32	-1,21	14,86
POC 5	A33	7,78	10,35
POC 5	A34	*	*
POC 6	A35	2,35	14,03
POC 6	A36	4,77	7,10
MÉDIA		5,68	12,94
EP		1,95	2,90

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 30 - Concentração média e erro padrão de Proteína Carbonil/Ureia (nmol/mg) presente no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo - 2013

	OCD	OA
	11,02	17,86
	4,23	9,47
	7,27	9,75
	13,92	1,78
	15,79	5,14
	12,3	5,76
	4,9	20,09
	15,45	2,05
	0	1,08
	7,78	14,34
	2,35	12,38
	4,77	8,51
MÉDIA	8,32	9,02
EP	1,53	1,80

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

APÊNDICE G

Tabela 31 - Viscosidade média e erro padrão do líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) as 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	1	1
COA 2	A2	3	3
COA 2	A3	1	1
COA 3	A4	1	1
COA 4	A5	3	3
COA 5	A6	*	*
COA 6	A7	2,5	3
COA 6	A8	*	*
MÉDIA		1,92	2,00
EP		0,42	0,45

1= viscosidade boa (>5); 2= viscosidade intermediária (2,5 a 5); 3= viscosidade ruim (<2)

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 32 - Viscosidade média e erro padrão do líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	1	3
POA 2	A10	1	3
POA 3	A11	3	3
POA 4	A12	2	3
POA 5	A13	2	3
POA 5	A14	1	3
POA 6	A15	3	2
POA 6	A16	1	2,5
POA 6	A17	1	2,5
MÉDIA		1,64a	2,77b
EP		0,27	0,17

1= viscosidade boa (>5); 2= viscosidade intermediária (2,5 a 5); 3= viscosidade ruim (<2)

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 33 - Viscosidade média e erro padrão do líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	1	3
COA 2	A2	1	2
COA 2	A3	1	2
COA 3	A4	2	2
COA 4	A5	3	3
COA 5	A6	*	*
COA 6	A7	2	2
COA 6	A8	*	*
MÉDIA		1,67	2,33
EP		0,33	0,21

1= viscosidade boa (>5); 2= viscosidade intermediária (2,5 a 5); 3= viscosidade ruim (<2)

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 34 - Viscosidade média e erro padrão do líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	3	3
POA 2	A10	1	2
POA 3	A11	2	2
POA 4	A12	1	2,5
POA 5	A13	2	3
POA 5	A14	1	2
POA 6	A15	1	2,5
POA 6	A16	1	2
POA 6	A17	1	2
MÉDIA		1,45a	2,36b
EP		0,25	0,21

1= viscosidade boa (>5); 2= viscosidade intermediária (2,5 a 5); 3= viscosidade ruim (<2)

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05..

*Amostra insuficiente para análise

APÊNDICE H

Tabela 36 - Qualidade média e erro padrão do precipitado de mucina do líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	1	1
COA 2	A2	2	3
COA 2	A3	2	2,5
COA 3	A4	4	4
COA 4	A5	*	*
COA 5	A6	*	*
COA 6	A7	2	3
COA 6	A8	*	*
MÉDIA		2,2a	2,7b
EP		0,45	0,45

1= ótima; 2= boa; 3= regular; 4= ruim

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 37 - Qualidade média e erro padrão do precipitado de mucina do líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma processado autólogo (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	*	*
POA 2	A10	2	2
POA 3	A11	2	2
POA 4	A12	2	2
POA 5	A13	1	2
POA 5	A14	1	3
POA 6	A15	1	2
POA 6	A16	1	3
POA 6	A17	2	3
MÉDIA		1,5a	2,37b
EP		0,61	0,28

1= ótima; 2= boa; 3= regular; 4= ruim

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 38 - Qualidade média e erro padrão do precipitado de mucina do líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	3	2
COC 2	A19	1	1
COC 3	A20	1	2
COC 3	A21	3	1
COC 3	A22	2	4
COC 4	A23	2	2
COC 5	A24	*	*
COC 6	A25	*	*
MÉDIA		2,00	2,00
EP		0,37	0,45

1= ótima ; 2= boa; 3= regular; 4= ruim

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P<0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 39 - Qualidade média e erro padrão do precipitado de mucina do líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	3	3
POC 1	A26	*	*
POC 2	A27	3	3
POC 3	A28	*	*
POC 3	A29	1	1,5
POC 4	A30	*	*
POC 4	A31	*	*
POC 5	A32	*	*
POC 5	A33	*	*
POC 5	A34	*	*
POC 6	A35	*	*
POC 6	A36	*	*
MÉDIA		2,33	2,50
EP		0,35	0,26

1= ótima; 2= boa; 3= regular; 4= ruim

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P<0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 40 - Qualidade média e erro padrão do precipitado de mucina do líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo – 2013

	OCD	OA
	3	1
	1	2
	1	2
	3	4
	2	2
	2	2
	3	2
	3	2
	1	1
		1
		1
		1
		2
MÉDIA	2,11	1,77
EP	0,31	0,23

1= ótima ; 2= boa; 3= regular; 4= ruim

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$

APÊNDICE I

Tabela 41 - Comparação do número de células nucleadas totais (cél/μL) no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo – 2013

	OCD	OA
	80	170
	80	60
	20	480
	27	500
	33	50
	62	38
	67	60
	50	55
	70	178
	145	275
	365	163
	135	225
	110	200
		238
MÉDIA	95,69a	192,29b
EP	24,84	39,71

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

APÊNDICE J

Tabela 42 - Concentração média e erro padrão de CS/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	0,27	1,00
COA 2	A2	0,08	0,31
COA 2	A3	0,10	*
COA 3	A4	*	0,20
COA 4	A5	0,15	0,08
COA 5	A6	0,13	0,39
COA 6	A7	0,15	0,14
COA 6	A8	0,09	0,30
MÉDIA		0,14a	0,34b
EP		0,02	0,12

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 43 - Concentração média e erro padrão de CS/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma processado autólogo (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	*	*
POA 2	A10	0,25	0,17
POA 3	A11	0,12	0,64
POA 4	A12	0,12	0,47
POA 5	A13	0,13	0,47
POA 5	A14	0,11	0,15
POA 6	A15	0,14	2,04
POA 6	A16	0,08	1,12
POA 6	A17	0,10	0,75
MÉDIA		0,13a	0,73b
EP		0,02	0,22

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 44 - Concentração média e erro padrão de CS/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	0,48	0,81
COC 2	A19	0,17	0,52
COC 3	A20	0,51	1,02
COC 3	A21	0,31	1,49
COC 3	A22	0,12	0,32
COC 4	A23	0,11	0,23
COC 5	A24	0,12	*
COC 6	A25	0,07	0,32
MÉDIA		0,24a	0,67b
EP		0,06	0,17

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 45- Concentração média e erro padrão de CS/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	0,22	1,05
POC 1	A26	0,22	0,68
POC 2	A27	0,12	0,42
POC 3	A28	0,20	0,28
POC 3	A29	0,20	1,00
POC 4	A30	0,38	0,23
POC 4	A31	0,12	0,23
POC 5	A32	0,27	0,90
POC 5	A33	0,30	0,57
POC 5	A34	*	*
POC 6	A35	0,20	0,27
POC 6	A36	0,07	0,87
MÉDIA		0,21a	0,59b
EP		0,03	0,10

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 46 - Concentração média e erro padrão de CS/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo - 2013

	OCD	OA
	0,48	0,27
	0,17	0,08
	0,51	0,10
	0,31	0,15
	0,12	0,13
	0,11	0,15
	0,12	0,09
	0,07	0,25
	0,22	0,12
	0,22	0,12
	0,12	0,13
	0,20	0,11
	0,20	0,14
	0,38	0,08
	0,12	0,10
	0,27	0,13
	0,30	
	0,20	
	0,07	
MÉDIA	0,22a	0,13b
EP	0,03	0,01

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

APÊNDICE L

Tabela 47 - Concentração média e erro padrão de AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	0,87	0,77
COA 2	A2	0,77	0,71
COA 2	A3	0,68	*
COA 3	A4	*	0,90
COA 4	A5	0,81	0,30
COA 5	A6	1,05	1,17
COA 6	A7	0,41	0,29
COA 6	A8	0,43	0,16
MÉDIA		0,72	0,62
EP		0,09	0,14

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 48 - Concentração média e erro padrão de AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma processado autólogo (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	*	*
POA 2	A10	0,83	0,56
POA 3	A11	0,59	0,93
POA 4	A12	0,56	0,37
POA 5	A13	0,98	1,07
POA 5	A14	0,96	1,09
POA 6	A15	1,14	1,93
POA 6	A16	0,94	0,87
POA 6	A17	0,59	1,32
MÉDIA		0,83	1,02
EP		0,08	0,17

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 49 - Concentração média e erro padrão de AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	2,91	3,45
COC 2	A19	1,51	1,78
COC 3	A20	1,87	2,16
COC 3	A21	1,64	2,38
COC 3	A22	0,82	0,75
COC 4	A23	1,73	1,01
COC 5	A24	0,75	*
COC 6	A25	0,78	0,93
MÉDIA		1,50	1,78
EP		0,26	0,37

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 50 - Concentração média e erro padrão de AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	0,82	1,40
POC 1	A26	1,06	0,90
POC 2	A27	0,94	0,96
POC 3	A28	1,37	0,49
POC 3	A29	1,21	0,71
POC 4	A30	2,39	1,14
POC 4	A31	2,80	1,17
POC 5	A32	2,11	1,42
POC 5	A33	1,75	1,10
POC 5	A34	*	*
POC 6	A35	0,88	0,70
POC 6	A36	1,11	0,98
MÉDIA		1,49a	1,00b
EP		0,20	0,09

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 51 - Concentração média e erro padrão de AH/Ureia ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) presente no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo - 2013

	OCD	OA
	2,91	0,87
	1,51	0,77
	1,87	0,68
	1,64	0,81
	0,82	1,05
	1,73	0,41
	0,76	0,43
	0,78	0,83
	0,82	0,59
	1,06	0,56
	0,94	0,99
	1,37	0,96
	1,21	1,14
	2,39	0,94
	2,80	0,59
	2,11	
	1,75	
	0,88	
MÉDIA	1,48a	0,74b
EP	0,16	0,06

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

APÊNDICE M

Tabela 52 - Concentração média e erro padrão de PGE₂/Ureia (pg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	116,84	95,60
COA 2	A2	71,78	73,89
COA 2	A3	*	*
COA 3	A4	*	87,72
COA 4	A5	*	*
COA 5	A6	64,92	49,23
COA 6	A7	155,86	43,80
COA 6	A8	112,95	60,26
MÉDIA		104,47	68,42
EP		16,58	8,53

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 53 - Concentração média e erro padrão de PGE₂/Ureia (pg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma processado autólogo (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	*	*
POA 2	A10	259,24	47,49
POA 3	A11	*	*
POA 4	A12	258,07	215,68
POA 5	A13	317,51	324,15
POA 5	A14	276,54	251,60
POA 6	A15	61,45	294,25
POA 6	A16	*	*
POA 6	A17	*	*
MÉDIA		234,56	226,63
EP		44,59	48,43

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 54 - Concentração média e erro padrão de PGE₂/Ureia (pg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	105,14	77,7
COC 2	A19	47,40	28,77
COC 3	A20	20,35	36,57
COC 3	A21	142,40	63,87
COC 3	A22	36,66	68,81
COC 4	A23	148,57	118,97
COC 5	A24	81,28	*
COC 6	A25	212,57	139,91
MÉDIA		99,30	76,37
EP		23,27	15,37

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 55 - Concentração média e erro padrão de PGE₂/Ureia (pg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	193,09	236,59
POC 1	A26	48,95	170,55
POC 2	A27	104,37	109,62
POC 3	A28	60,77	35,83
POC 3	A29	26,96	35,35
POC 4	A30	45,84	6,19
POC 4	A31	76,01	32,62
POC 5	A32	36,71	38,95
POC 5	A33	63,05	32,96
POC 5	A34	*	*
POC 6	A35	172,68	89,59
POC 6	A36	57,17	26,68
MÉDIA		80,51	74,08
EP		16,51	21,68

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 56 - Concentração média e erro padrão de PGE₂/Ureia (pg/mg) presente no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo – 2013.

	OCD	OA
	105,14	116,84
	47,4	71,78
	20,35	64,92
	142,4	155,86
	36,66	112,95
	148,57	259,24
	81,28	258,07
	212,57	317,51
	193,09	276,54
	48,95	61,45
	104,37	218,65
	60,77	
	26,96	
	45,84	
	76,01	
	36,71	
	63,05	
	172,68	
	57,17	
MÉDIA	88,42a	173,98b
EP	13,46	28,57

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

APÊNDICE N

Tabela 57 - Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	0,03	*
COA 2	A2	0,04	*
COA 2	A3	0,04	*
COA 3	A4	*	0,05
COA 4	A5	0,04	0,18
COA 5	A6	0,02	0,07
COA 6	A7	0,04	0,05
COA 6	A8	0,03	0,04
MÉDIA		0,03	0,08
EP		0,00	0,03

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 58 - Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma autólogo condicionado (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	*	*
POA 2	A10	0,04	0,04
POA 3	A11	0,03	0,06
POA 4	A12	0,06	0,11
POA 5	A13	0,05	0,08
POA 5	A14	0,07	0,06
POA 6	A15	0,06	0,20
POA 6	A16	0,06	0,16
POA 6	A17	0,04	0,10
MÉDIA		0,05a	0,10b
EP		0,01	0,02

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 59 - Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A18	0,04	0,05
COC 2	A19	0,02	0,03
COC 3	A20	0,03	0,04
COC 3	A21	0,03	0,07
COC 3	A22	0,03	0,05
COC 4	A23	0,03	0,06
COC 5	A24	0,04	*
COC 6	A25	0,03	0,06
MÉDIA		0,03a	0,05b
EP		0,00	0,00

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 60 - Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A25	0,04	0,08
POC 1	A26	0,03	0,07
POC 2	A27	0,02	0,06
POC 3	A28	0,02	0,03
POC 3	A29	0,02	0,06
POC 4	A30	0,05	*
POC 4	A31	0,08	0,05
POC 5	A32	0,03	0,06
POC 5	A33	0,03	0,07
POC 5	A34	*	*
POC 6	A35	0,02	0,06
POC 6	A36	0,02	0,03
MÉDIA		0,03	0,06
EP		0,01	0,01

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 61 - Concentração média e erro padrão de Proteína Total/Ureia (mg/mg) presente no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas - São Paulo - 2013

	OCD	OA
	0,04	0,03
	0,02	0,04
	0,03	0,04
	0,03	0,04
	0,03	0,02
	0,03	0,04
	0,04	0,03
	0,03	0,04
	0,04	0,03
	0,03	0,06
	0,02	0,05
	0,02	0,07
	0,02	0,06
	0,05	0,06
	0,08	0,04
	0,03	0,05
	0,03	
	0,02	
	0,02	
MÉDIA	0,03a	0,04b
EP	0,00	0,00

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

APÊNDICE O

Tabela 62 - Concentração média e erro padrão de Ureia (mg/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite controle (COA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COA 1	A1	0,21	0,37
COA 2	A2	0,29	0,32
COA 2	A3	0,27	*
COA 3	A4	*	0,32
COA 4	A5	0,40	0,31
COA 5	A6	0,26	0,30
COA 6	A7	0,55	0,52
COA 6	A8	0,53	0,50
MÉDIA		0,36	0,38
EP		0,05	0,03

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 63 - Concentração média e erro padrão de Ureia (mg/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteoartrite tratado com plasma processado autólogo (POA) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POA 1	A9	*	*
POA 2	A10	0,39	0,42
POA 3	A11	0,29	0,30
POA 4	A12	0,33	0,27
POA 5	A13	0,39	0,31
POA 5	A14	0,37	0,31
POA 6	A15	0,34	0,15
POA 6	A16	0,33	0,15
POA 6	A17	0,30	0,14
MÉDIA		0,34a	0,26b
EP		0,01	0,04

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 64 - Concentração média e erro padrão de Ureia (mg/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose controle (COC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
COC 1	A17	0,29	0,25
COC 2	A18	0,48	0,42
COC 3	A19	0,38	0,40
COC 3	A20	0,40	0,37
COC 3	A21	0,38	0,43
COC 4	A22	0,27	0,36
COC 5	A23	0,27	*
COC 6	A24	0,27	0,40
MÉDIA		0,34	0,38
EP		0,03	0,02

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 65 - Concentração média e erro padrão de Ureia (mg/mL) presente no líquido sinovial coletado das articulações do grupo osteocondrose tratado com plasma processado autólogo (POC) às 0 e 48 horas – São Paulo – 2013

Animal	Articulação	0h	48h
POC 1	A24	0,22	0,18
POC 1	A25	0,26	0,25
POC 2	A26	0,31	0,29
POC 3	A27	0,31	0,48
POC 3	A28	0,35	0,46
POC 4	A29	0,27	0,55
POC 4	A30	0,25	0,46
POC 5	A31	0,38	0,47
POC 5	A32	0,38	0,44
POC 5	A33	*	*
POC 6	A34	0,34	0,49
POC 6	A35	0,27	0,45
MÉDIA		0,30a	0,41b
EP		0,02	0,03

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

*Amostra insuficiente para análise

Tabela 66 - Concentração média e erro padrão de Ureia (mg/mL) presente no líquido sinovial na OCD e na OA no momento 0 horas – São Paulo - 2013

	OCD	OA
	0,29	0,21
	0,48	0,29
	0,38	0,27
	0,4	0,4
	0,38	0,26
	0,27	0,55
	0,27	0,53
	0,27	0,39
	0,22	0,29
	0,26	0,33
	0,31	0,39
	0,31	0,37
	0,35	0,34
	0,27	0,33
	0,25	0,3
	0,38	
	0,38	
	0,34	
	0,27	
MÉDIA	0,32	0,35
EP	0,02	0,02

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.