KAIO BARROS BEZERRA

Avaliação da superfície articular de ovinos e equinos
submetidos a irrigação articular com solução de Ringer com
lactato em diferentes temperaturas

São Paulo

2014

KAIO BARROS BEZERRA

**Avaliação da superfície articular de ovinos e equinos submetidos a
irrigação articular com solução de Ringer com lactato em diferentes
temperaturas**

São Paulo

2014

KAIO BARROS BEZERRA

Avaliação da superfície articular de ovinos e equinos submetidos a irrigação articular com solução de Ringer com lactato em diferentes temperaturas

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Luís Cláudio Lopes Correia da Silva

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.3016
FMVZ

Bezerra, Kaio Barros

Avaliação da superfície articular de ovinos e equinos submetidos a irrigação articular com
solução de Ringer com lactato em diferentes temperaturas / Kaio Barros Bezerra. -- 2014.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva.

1. Ovino. 2. Equino. 3. Temperatura intra-articular. 4. Artroscopia. 5. MEV. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da superfície articular de ovinos e equinos submetidos a irrigação articular com solução de ringer com lactato em diferentes temperaturas", protocolado sob o nº 2591/2012, utilizando 12 (doze) carneiros e 6 (seis) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, 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 15/2/2012.

We certify that the Research "Articular surface evaluation of sheep and horses submitted to joint infusion with ringer lactate solution at different temperatures", protocol number 2591/2012, utilizing 12 (twelve) sheep and 6 (six) horses, under the responsibility Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BEZERRA, Kaio Barros

Título: Avaliação da superfície articular de ovinos e equinos submetidos a irrigação articular com solução de ringer com lactato em diferentes temperaturas

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, responsáveis pela minha formação educacional e de caráter, que sempre apoiaram minhas escolhas e decisões.

Ildete Barros Bezerra

José Carlos Mendes Bezerra
(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter direcionado meu caminho e me colocado ao lado de pessoas boas, que me ajudaram muito até aqui, me dando forças para suportar perdas importantes em momento tão delicado.

Ao meu pai, por todos os ensinamentos, educação da qual me orgulho, pelos incentivos de superação e pelo prazer de poder ter sido seu melhor amigo. Agora estou voltando pra casa, Pai. Talvez um pouco tarde. A cada passo que eu dou, a cada noite que eu rezo, a cada único dia, sento sua falta, MEU VELHO!

À minha querida mãe, pela confiança em mim depositada em todos os momentos da minha vida, pelos carinhos trocados em qualquer momento de encontro, pelo pedaço de cama que durante tantas noites dividimos. Estou voltando pra junto da nossa família, Mãe. Espero que um dia todas vocês possam sentir em mim a força que tinha o nosso Rei.

Às mulheres da minha vida, Karla, Kássia, Karenn, Marília, Cacá e Babi. Tenho o orgulho de dizer que junto com mamãe, vocês completam a casa das Sete Mulheres e fazem de mim o filho, irmão, tio e padrinho mais amado desse mundo.

À minha namorada, Livia, pelo amor, pelos anos de convivência e troca de aprendizado, pelo exemplo de como se amar uma família e, claro, pela paciência em suportar todos os meus defeitos.

Ao meu orientador, por acreditar na minha capacidade, pelos ensinamentos, pela amizade adquirida durante os anos de residência e mestrado e pelo incentivo profissional.

Aos amigos de trabalho, Júlio e Paulo pelo apoio e troca de conhecimentos tão importantes para minha formação profissional e pelos momentos de descontração, que foram muitos.

À amigas de pós-graduação, Fernanda, Cristina, Marilene e Thaís, pelo apoio incondicional na elaboração, execução e análise das amostras. Em especial à Fê, que foi parceira incansável em todas as cirurgias e executora das avaliações laboratoriais, fazendo por mim o que não pude fazer enquanto estive do lado do meu pai. Serei eternamente grato!

Aos professores Stefano, Wilson, André, Raquel e Carla, por terem me ensinado muito sobre os cavalos e pelos ensinamentos de vida.

À professora Sílvia Cortopassi, por ter me acolhido desde a minha chegada, dando apoio e sempre perguntando se estavam me tratando bem.

Aos funcionários do HOVET: Marquinhos, Henrique, Rosendo, Gervásio, Ganga e Cícero, que direta ou indiretamente me ajudaram nesses anos de hospital.

À Fapesp pelo apoio aos projetos realizados e pela bolsa de mestrado.

À todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram nessa passagem por São Paulo, recebam o meu muito obrigado.

RESUMO

BEZERRA, K. B. **Avaliação da superfície articular de ovinos e equinos submetidos a irrigação articular com solução de Ringer com lactato em diferentes temperaturas.** [Articular surface evaluation of sheep and horses subjected to articular irrigation with Ringer lactate at different temperatures.]. 2014. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A artroscopia tem função diagnóstica e terapêutica na doença articular. Mesmo com as modalidades de imagem mais modernas, ainda é considerada como padrão ouro no diagnóstico de problemas articulares em equinos. Sabe-se que as características físico-químicas das diferentes soluções de infusão podem determinar alterações estruturais na superfície da cartilagem. Apesar da existência de estudos baseados na busca de um fluido ideal para irrigação durante a artroscopia, com principal foco nas características bioquímicas do líquido, poucos trabalhos testaram características físicas destes fluidos, como a temperatura. Na primeira etapa deste trabalho foram avaliadas 24 articulações de ovinos submetidas à irrigação articular com solução de Ringer com lactato condicionado a quatro diferentes temperaturas (5, 12, 25 e 38 °C). Para avaliação de cada grupo foram coletadas biopsias comparativas de membrana sinovial e de cartilagem com osso subcondral da articulação femoropatelar visando análise histológica e por microscopia eletrônica de varredura, respectivamente, imediatamente antes do início da infusão do líquido e após uma hora de infusão. Apesar de alterações na ultraestrutura da superfície articular terem sido observadas após lavagem das articulações, nenhuma diferença estatística entre os grupos foi identificada. Na segunda etapa do experimento foram testadas as temperaturas 5, 25 e 38 °C do Ringer com lactato utilizado para irrigação articular durante procedimentos artroscópicos em 12 articulações radiocárpicas de seis equinos. As articulações foram divididas em três grupos de quatro, sendo avaliados, além da membrana sinovial e cartilagem, o líquido sinovial previamente ao início da infusão com fluido condicionado e 12, 24 e 48 horas após o término da irrigação, visando análise comparativa das concentrações de IL-1 β , PGE₂, TNF- α , condroitim sulfato (CS) e ácido hialurônico (AH). As alterações da superfície articular dos equinos decorrentes da irrigação também foram independentes da temperatura

utilizada. Houve um aumento significativo das concentrações de PGE₂ e IL-1 β no líquido sinovial às 12 horas em todos os grupos, exceto para IL-1 β no grupo de articulações irrigadas com fluido a 38 °C, que não apresentou alteração nas concentrações. A análise de TNF- α não revelou diferença significativa entre os grupos. As concentrações de CS aumentaram às 24 horas nos três grupos e foi estatisticamente maior no grupo irrigado a 38 °C. Não houve diferença significativa das concentrações de AH no líquido sinovial do grupo de articulações irrigadas a 25 °C, o que não ocorreu nos grupos 5 e 38 °C, havendo diminuição às 24 e 12 horas, respectivamente, retornando aos valores basais na coleta subsequente. As biopsias de membrana sinovial coletadas em ambas as etapas do experimento não demonstraram alteração estrutural ou migração celular que inferissem em resposta inflamatória ao insulto. As alterações da ultraestrutura da superfície da cartilagem estão mais relacionada ao fator mecânico da passagem do líquido que à temperatura de acondicionamento. Apesar de mais análises serem necessárias para definição da melhor temperatura a ser utilizada durante as artroscopias, a detecção de menores concentrações de IL-1 β nas articulações de equinos irrigadas com Ringer com lactato a 38 °C sugerem de que essa seja a temperatura menos deletéria para o ambiente articular.

Palavras-chave: Ovino. Equino. Temperatura intra-articular. Artroscopia. MEV.

ABSTRACT

BEZERRA, K. B. **Articular surface evaluation of sheep and horses subjected to articular irrigation with Ringer lactate at different temperatures.** [Avaliação da superfície articular de ovinos e equinos submetidos a irrigação articular com solução de Ringer com lactato em diferentes temperaturas.]. 2014. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Arthroscopy has a diagnostic and a therapeutic function in joint disease. Even with modern imaging modalities, it is still considered the gold standard for diagnosing equine joint problems. It is known that the physicochemical characteristics of different infusion solutions could influence structural modifications on cartilage surface. A number of studies have described the search for the ideal fluid to be used for irrigation during arthroscopy, focusing on the biochemical characteristics of the various liquids. However, few works have taken temperature into consideration when studying the physical characteristics of these fluids. Therefore, in the first phase of this study four different temperatures of Ringer lactate used for articular irrigation were assessed into four groups of six ovine joints each (5, 12, 25 and 38 °C). To evaluate each group, comparative synovial membrane and osteochondral samples were collected from the patellofemoral joints for histological analysis and Scanning Electron Microscopy, respectively, immediately before and 1 hour after starting fluid infusion. Ultrastructural changes of the joint surfaces after irrigation were observed, but no statistical differences between groups were identified. In the second phase of this study, lactated Ringer's solution was assessed at three different temperatures: 5, 25 and 38°C, for irrigation of 12 radiocarpal joints of six horses during arthroscopy. Three groups of four joints were studied to evaluate synovial membrane, cartilage and synovial liquid immediately before and 12, 24 and 48 hours after joint irrigation. These samples were subjected to comparative analysis of IL-1 β , PGE₂, TNF- α , chondroitin sulfate (CS) and hyaluronic acid (HA) concentrations. Changes of equine joint surfaces were also independent of temperature. There was a significant increase in the PGE₂ and IL-1 β concentrations in the synovial liquid at 12 hours in all groups except for IL-1 β on the joints irrigated with fluid at 38°C, which did not show concentrations changes. There was no statistical difference of TNF- α between

groups. CS concentrations had a significant increase at 24 hours in all groups, meanwhile in the 38 °C group this increased was statistically greater. There was no statistical difference for HA concentrations on synovial liquid of the irrigated joints at 25 °C. In the 5 and 38 °C groups there were synovial fluid HA decrease at 24 and 12 hours, respectively, returning to basal values at the subsequent collect. The synovial membrane biopsies collected in the both steps of this study did not show any structural alterations or cellular migration that might interfere in response to inflammatory insult. Ultrastructural changes in articular most superficial zone are more related to mechanic action of fluid lavage than irrigation solution's temperature. Although more tests needs to be done, the lowest concentrations of IL-1 β in equine joints irrigated with Ringer lactate at 38 °C give some evidence that this is the less deleterious temperature to articular environment.

Keywords: Ovine. Equine. Intra-articular temperature. Arthroscopy. SEM.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO	osteoartrite
MEV	microscopia eletrônica de varredura
RL	Ringer com lactato
LS	líquido sinovial
CS	condroitim sulfato
DS	dermatam sulfato
KS	queratam sulfato
AH	ácido hialurônico
MEC	matriz extracelular
PGs	proteoglicanos
GAGs	glicosaminoglicanos
PGE ₂	prostaglandina E ₂
TNF- α	fator de necrose tumoral
IL-1 β	interleucina 1 β
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-1ra	antagonista do receptor de interleucina 1
MMP	metaloprotease de matriz
LPS	endotoxina de parede celular Gram negativa
PAM	pressão arterial média
mpm	movimento por minuto
SCGA	Serviço de Cirurgia de Grandes Animais
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
USP	Universidade de São Paulo
Na	sódio
L.S.	limite superior
L.I.	limite inferior
CS846	epítipo 846 de condroitim sulfato
min	minutos
T0	antes do procedimento de lavagem articular
T1	após o procedimento de lavagem articular

HE	hematoxilina-eiosina
pH	potencial hidrogeniônico
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
IV	intravenosa

LISTA DE SÍMBOLOS

mg	miligrama
µg	micrograma
pg	picograma
µL	microlitro
mL	mililitro
dL	decilitro
nm	nanômetro
mm	milímetro
kg	quilograma
mmHg	milímetro de mercúrio
α	alfa
β	beta
/	por
°C	graus Celsius
°	graus
%	porcentagem
³⁵ SO ₄	sulfato radioisótopo 35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CARTILAGEM ARTICULAR	19
2.2	OSTEOARTRITE	22
2.3	ARTROSCOPIA	23
2.4	CARACTERÍSTICAS DO FLUIDO DE INFUSÃO	24
2.4.1	Características químicas	24
2.4.2	Características físicas	26
2.5	MARCADORES INFLAMATÓRIOS	27
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS	32
5	MATERIAL E MÉTODO	33
5.1	CONTROLE DA TEMPERATURA	33
5.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	35
5.2.1	Ovinos	35
5.2.2	Equinos	40
5.3	ANÁLISES LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS	46
5.3.1	Cartilagem	47
5.3.2	Membrana sinovial	52
5.3.3	Líquido sinovial	54
5.3.3.1	Determinação das concentrações de ureia no líquido sinovial	54
5.3.3.2	Determinação das concentrações de PGE ₂ no líquido sinovial	55
5.3.3.3	Determinação das concentrações de IL-1 β no líquido sinovial	56
5.3.3.4	Determinação das concentrações do TNF- α no líquido sinovial	56
5.3.3.5	Determinação das concentrações de GAGs no líquido sinovial	57
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
7	RESULTADOS	61
7.1	OVINOS	61
7.1.1	Monitoramento das temperaturas	61
7.1.1.1	Temperatura retal	61

7.1.1.2	Temperatura articular	62
7.1.2	Cartilagem articular	64
7.1.3	Membrana sinovial	66
7.2	EQUINOS	67
7.2.1	Monitoramento das temperaturas	67
7.2.1.1	Temperatura retal	67
7.2.1.2	Temperatura articular	69
7.2.2	Cartilagem articular	70
7.2.3	Membrana sinovial	72
7.2.4	Determinação da PGE₂ no líquido sinovial	74
7.2.5	Determinação da IL-1β no líquido sinovial	79
7.2.6	Determinação da TNF-α no líquido sinovial	83
7.2.7	Determinação dos GAGs no líquido sinovial	83
7.2.7.1	Condroitím sulfato	83
7.2.7.2	Ácido hialurônico	88
7.2.8	Correlações	92
8	DISCUSSÃO	97
9	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

A artroscopia tem função diagnóstica e terapêutica na doença articular. Mesmo com as modalidades de imagem mais modernas, ainda é considerada como padrão ouro no diagnóstico de problemas articulares em equinos. Para a realização da artroscopia necessita-se da infusão de líquido na cavidade articular, que proporciona distensão da cápsula para visualização das estruturas intra-articulares. Durante o procedimento um portal de saída da solução infundida é aberto para troca constante do líquido e manutenção do campo visual limpo. Em articulações com osteoartrite (OA) esse sistema de infusão contínua favorece o egresso do líquido sinovial (LS), que carrega citocinas e restos de cartilagem que contribuem para manutenção da doença, podendo, assim, trazer benefício terapêutico (FRISBIE, 2012).

Muitas pesquisas têm sido feitas na busca do líquido ideal para infusão durante os procedimentos artroscópicos. Modelos animais foram desenvolvidos por pesquisadores para os mais variados testes, bioquímicos e biomecânicos, testando diferentes líquidos de infusão. Os resultados mostram que, de maneira geral, os fluidos não iônicos e isotônicos seriam os menos prejudiciais durante a lavagem articular na artroscopia, proporcionando menor liberação de proteoglicanos de superfície e alterando as características bioquímicas e biomecânicas da cartilagem articular em menores proporções (BERT et al., 1990; GRADINGER; TRÄGER; KLAUSER, 1995; GULIHAR; BRYSON; TAYLOR, 2013; JURVELIN et al., 1994).

Os testes com diferentes temperaturas da solução de irrigação sugerem que o líquido infundido a 4 ou 5 °C, além de causarem maiores danos à ultraestrutura de superfície da cartilagem articular, suprimem o metabolismo dos condrócitos e, consequentemente, a síntese de RNA que controla a produção de elementos da matriz extracelular. Tais respostas seriam evitadas com a utilização da solução de infusão a temperaturas mais elevadas (32 e 38 °C) (CHENG et al., 2004; KOCAOGLU et al., 2011).

A avaliação de diferentes temperaturas de infusão de fluidos durante as artroscopias em modelo animal, utilizando-se equinos, nunca foi realizada. Uma vez que a OA espontânea é um problema comum nos cavalos, e diante da necessidade

de identificação das características físicas ideais dos líquidos de irrigação, faz-se necessária tal avaliação.

Desta forma, na primeira etapa deste experimento, foram avaliadas comparativamente as alterações de ultraestrutura da superfície da cartilagem articular por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por cortes histológicos da membrana sinovial, antes do início do procedimento artroscópico para infusão do Ringer com lactato (RL) e após uma hora de lavagem, em quatro grupos (5, 12, 25 e 38 °C) de seis articulações de ovinos. Na segunda etapa, além das avaliações de ultraestrutura da cartilagem e de histologia da membrana sinovial, as concentrações de IL1- β , TNF- α , PGE₂, condroitim sulfato (CS) e ácido hialurônico (AH) do líquido sinovial foram avaliadas antes do início da infusão e 12, 24 e 48 horas após o término da lavagem, em três grupos de quatro articulações de equinos, submetidos a uma hora de lavagem com Ringer com lactato a 5, 25 e 38 °C.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo especializado avascular e aneural, com grande quantidade de matriz extracelular (MEC), que é produzida pelos condrócitos. Enquanto a MEC é o componente funcional da cartilagem articular, os condrócitos são responsáveis pela homeostase desse tecido (AIGNER; SOEDER; HAAG, 2006). A cartilagem atua distribuindo carga, absorvendo impacto, suportando forças de tensão e pressão e reduzindo atrito do movimento articular. Essas características estão diretamente relacionadas com a estrutura e composição complexas da MEC (MARTEL-PELLETIER et al., 2008), que tem como composição principal uma intensa rede de fibras de colágeno, agregados de proteoglicanos (PGs) e AH, além de água, sais inorgânicos e pequenas quantidades de outras proteínas, glicoproteínas e lipídios, gerando uma matriz densa.

A principal macromolécula encontrada na matriz é o colágeno (60%) dos tipos IX, XI e, predominantemente, II. Este colágeno fica embebido em um firme gel hidratado de proteoglicanos (GOLDRING, 2000; TYYNI; KARLSSON, 2000; VANWANSEEELE; LUCCHINETTI; STUSSI, 2002) (Figura 1).

Figura 1 – Ilustração da cartilagem articular e seus principais componentes

Fonte: (FLUGGE; MILLER-DEIST; PETILLO, 1999). Tradução do autor.

Nota: (a) À esquerda representação macroscópica da cartilagem dentro da articulação. Em destaque, componentes da cartilagem: condrócitos embebidos na matriz extracelular de agregam e colágeno. (b) Esquema do agregado de proteoglicanos (área da caixa ampliada para mostrar detalhes). Os esqueletos protéicos que carregam glicosaminoglicanos se arranjam lateralmente a intervalos regulares por sobre a coluna do ácido hialurônico, através de ligações não covalentes com as proteínas de ligação.

Os PGs são macromoléculas formadas por um esqueleto proteico com cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) covalentemente ligadas (NELSON; COX, 2008). Existem seis tipos principais de GAGs em mamíferos: CS, dermatam sulfato (DS), queratam sulfato (KS), heparam sulfato, heparina e AH. O AH não ocorre nos tecidos na forma de PG e não é sulfatado. Os principais GAGs da MEC da cartilagem são AH, CS e KS. O DS também está presente, mas em menor proporção. O PG predominante na cartilagem articular é o agregam, que é constituído por um esqueleto proteico ao qual estão covalentemente ligadas moléculas de CS, KS, além de oligossacarídeos N- e O- ligados (HARDINGHAM; ELUINS; MUIR, 1976; HEINEGÅRD; HASCALL, 1974). O agregam é encontrado em forma de enormes agregados (SAJDERA; HASCALL, 1969), compostos por vários monômeros de PG ligados de forma não-covalente a uma molécula de AH (HASSELL; KIMURA, HASCALL, 1986) (Figura 2).

Figura 2 – Ilustração da composição do Agregam

Fonte: (FLUGGE; MILLER-DEIST; PETILLO, 1999). Tradução do autor.

Os GAGs são fortemente hidrofílicos e por isso formam géis mesmo em baixas concentrações. Além disso, possuem múltiplas cargas negativas que atraem cátions como o sódio, que são osmoticamente ativos, fazendo com que grandes quantidades de água sejam atraídas para o interior da MEC, proporcionando sua expansão. Além disso, os monômeros de PGs repelem-se por terem a mesma carga. Essas duas situações criam uma pressão interna que é balanceada pela tensão das fibras colágenas, que fornece resistência a essa expansão. Os PGs, além de preencherem o espaço da matriz, resistem à compressão. Sendo assim, a grande quantidade de GAGs e colágeno permite, respectivamente, grande pressão interna e tensão de contrabalanço, o que dá à cartilagem sua característica de resistência (AROKOSKI et al., 2000; NARMONEVA; WANG; SETTON, 2001).

A deformação da cartilagem articular é fortemente influenciada pelos PGs presentes no tecido. Uma diminuição do conteúdo de PGs na cartilagem, como durante a OA, proporciona uma deformação maior e mais rápida da cartilagem quando sob carga *in vivo*. Concomitantemente, a absorção de energia nos tecidos aumenta, com a formação de calor como possível consequência (LEE et al., 1981).

Distribuída em lacunas entre a matriz, existe uma esparsa população de condrócitos. São eles os responsáveis pela síntese e manutenção dos componentes da matriz, sendo que a produção e degradação são baseadas na presença de citocinas anabólicas e catabólicas enviadas e recebidas pela própria matriz (GOLDRING, 2000; TYYNI; KARLSSON, 2000).

2.2 OSTEOARTRITE

A OA foi considerada, no passado, uma doença degenerativa que acometia as articulações diartrodiais, fazendo parte do envelhecimento natural. Entretanto, atualmente, é considerada um processo de intensa atividade metabólica das células da cartilagem articular, que induz aumento da produção de elementos estruturais, na tentativa de reparar a perda de componentes degradados pela doença. Tal atividade de regeneração, quando sobrepujada pela degradação em ritmo acelerado, leva a um estado de deficiência osteocartilaginosa, concepção que melhor define a OA (VELOSA et al., 2003).

A OA espontânea é um problema comum nos cavalos (MCILWRAITH et al., 2010), podendo ocorrer precocemente nos cavalos atletas ou mais tarde no cavalo idoso (MCILWRAITH, 1982).

O emprego de animais como modelos experimentais para o estudo da patogênese de diversas afecções permitiu um avanço na descoberta de várias modalidades de tratamento, sejam eles clínicos ou cirúrgicos, propiciando o alívio dos sintomas ou erradicação das doenças tanto em humanos como nos animais (SWINDLE; ADAMS, 1988). Os cavalos são bons modelos para estudos translacionais de OA em humanos por causa de suas habilidades atléticas, capacidade de controlar o exercício, além do tamanho das articulações que favorecem a avaliação artroscópica, coleta de amostras significativas durante a cirurgia e artrocenteses seriadas (BOYCE et al., 2013). O joelho de ovinos também é um bom modelo biomecânico de comparação com os humanos uma vez que as estruturas sobre carga durante a movimentação são similares entre as espécies (NESBITT et al., 2014).

2.3 ARTROSCOPIA

A artroscopia nos equinos foi primeiramente descrita como uma ferramenta diagnóstica de visualização de lesões não detectáveis pelo exame radiográfico ou outro método de diagnóstico por imagem de rotina, embora posteriormente tenha sido empregada com propósito terapêutico, como a remoção cirúrgica de fragmentos osteocondrais ou resolução de fraturas (FRISBIE, 2012).

O procedimento artroscópico, que tem sido usado de maneira mais difundida nos últimos 30 anos, requer distensão da articulação por líquido ou gás, sendo que, quando por líquidos, geralmente com temperaturas mais baixas do que o interior articular (SÁNCHEZ-INCHAUSTI; VAQUERO-MARTÍN; VIDAL-FERNÁNDEZ, 2005). Embora a influência da solução de infusão não seja um problema proeminente, estudos têm mostrado que a infusão contínua com diversas soluções pode ter efeito significativo no metabolismo da cartilagem, resultando em alterações morfológicas (CHENG et al., 2004), assim como na temperatura corpórea do paciente, podendo

causar hipotermia em humanos (SÁNCHEZ-INCHAUSTI; VAQUERO-MARTÍN; VIDAL-FERNÁNDEZ, 2005).

2.4 CARACTERÍSTICAS DOS FLUIDOS DE INFUSÃO

2.4.1. Características químicas

Vários fluidos têm sido usados para distender a articulação e irrigar a cavidade sinovial durante e após os procedimentos artroscópicos. Baseado no fato de que a captação de enxofre é proporcional à atividade metabólica dos condrócitos (COLLINS; MCELLIGOTT, 1960), Reagan et al. (1983) reportaram que a solução de Ringer com lactato (RL) manteve a atividade metabólica da cartilagem bovina *in vitro* através de teste com sulfato radiomarcado ($^{35}\text{SO}_4$), sendo considerada mais “fisiológica” para artroscopia do que a solução salina. Entretanto, Arciero et al. (1986), usando o mesmo teste, relataram que as soluções de RL, salina e água destilada não apresentaram efeito adverso na cartilagem das articulações femoropatetales de coelhos *in vivo*.

Paralelamente, Bert (1987) e Reagan et al. (1991) mostraram que as soluções de baixa condutividade, quando em contato com a cartilagem, não apresentaram alterações estruturais à histologia (glicina 1,5%) e mantiveram o metabolismo dos condrócitos pela captação de $^{35}\text{SO}_4$ (glicerol 2,6%). Contudo, em outro estudo, Bert et al. (1990), usando MEV, observaram mudanças estruturais significantes na cartilagem examinada por biopsia de articulações do joelho de humanos após irrigação com glicerol, RL, solução salina e água destilada. Neste trabalho os indivíduos que receberam a irrigação com glicina 1,5% mostraram aparência mais lisa e regular da cartilagem que os demais grupos.

Essa diversidade de resultados foi atribuída às condições não controladas, como apresentação inicial de cada articulação, procedimento de biopsia inadequado e injúrias variadas na cartilagem.

Yang, Cheng e Shen (1993) testaram a irrigação da articulação femoropatelar de ratos com quatro diferentes soluções (RL, sorbitol 3%, solução salina e água

destilada) e não observaram nenhum dano à cartilagem articular normal. Nesse trabalho os ratos eram da mesma raça e tinham a mesma idade. Para avaliação, toda a patela foi dissecada para evitar danos pela biopsia e o processamento para avaliação por MEV era padronizado.

O cálculo de propriedades mecânicas da cartilagem articular pode ser usado como ferramenta sensível precoce em degenerações articulares (LANE; CHISENA; BLACK, 1979). Como consequência à carga estabelecida, a cartilagem deforma, mudando sua configuração, e a água de sua matriz é comprimida para fora em uma velocidade controlada pela permeabilidade tecidual (MAROUDAS, 1968). As características físico-químicas do fluido de imersão têm efeitos significantes no comportamento mecânico da cartilagem sob carga (SOKOLOFF, 1963).

Baseado no fato de que o conteúdo, a qualidade e as interações dos principais componentes estruturais da matriz cartilágnea, assim como o conteúdo aquoso intersticial, determinam as propriedades bioquímicas do tecido articular (MYERS; ZHU; MOWI, 1988), Jurvelin et al. (1994) fizeram avaliação mecânica de fragmentos de cartilagem da articulação femoropatelar de bovinos, imersos em diferentes tipos de soluções. As fatias da cartilagem extraídas do osso que foram incubadas em solução de RL apresentaram uma deformação 34% maior que as amostras imersas em soluções contendo sacarídeos (frutose % e manitol 5%).

Gradinger, Trager e Klauser (1995) fizeram um estudo com cartilagem bovina, testando fluidos de imersão iônicos e não iônicos, identificando que a liberação de PGs foi maior nos iônicos (solução salina e RL) do que nos fluidos de imersão que continham algum polissacarídeo (sorbitol e manitol) em diferentes concentrações. Neste estudo os fragmentos de cartilagem bovina foram avaliados por MEV. Os resultados comprovaram que os líquidos de imersão que proporcionavam maior liberação de PGs também estavam relacionados com maior apresentação de defeitos na ultraestrutura da superfície articular dos fragmentos imersos. Desta forma, concluíram que as soluções isotônicas, como o manitol a 5%, devem ser preferidas durante o procedimento artroscópico, para diminuir a perda desnecessária de PGs da cartilagem.

Gulihar, Bryson e Taylor (2013), usando o teste de captação de $^{35}\text{SO}_4$, demonstraram que os fluidos não iônicos manitol 5% e glicina 1,5% inibiram a atividade metabólica da cartilagem em 31% e 24%, respectivamente, enquanto que a solução iônica de Ringer inibiu apenas 10%, quando comparados com as

amostras de cartilagem que foram incubadas em meio de cultura rico (M199 – controle normal). Porém, só encontraram diferença significativa na inibição do metabolismo quando compararam o Ringer com a solução salina, que inibiu 35%. Desta forma concluíram que a solução salina pode ter efeito inibitório no metabolismo de PGs da cartilagem.

Utilizando a produção de mRNA pelos condrócitos como forma de avaliação do metabolismo da cartilagem, Akgun et al. (2013) testaram diferenças pequenas do pH do RL utilizado para incubação de fragmentos osteocondrais de bovinos em laboratório. As amostras incubadas em solução com pH igual ao da articulação do joelho dos bovinos (7,4) mantiveram uma produção de mRNA significativamente maior que as amostras incubadas a 7,2 ou 7,6 de pH.

2.4.2. Características físicas

Cheng et al. (2004) sugeriram a avaliação da temperatura do fluido de irrigação nas artroscopias baseados na hipótese de que, assim como a constituição química da solução de infusão, a temperatura também determinaria um efeito sobre a cartilagem.

Nesse estudo trinta ratos foram divididos em três grupos que passaram por procedimento cirúrgico para montagem de um sistema de irrigação articular, sendo que cada grupo recebeu infusão na taxa de 200 ml/h de solução salina nas temperaturas de 4, 25 e 37 °C (grupos I, II e III, respectivamente). Ao final de 2 horas de irrigação, as temperaturas corpórea e intra-articular dos grupos caíram, sendo que as referentes ao grupo III mantiveram-se mais próximas dos valores aferidos no momento imediatamente antes do início da infusão. Na avaliação por microscopia eletrônica de varredura, sob os aumentos de 1000 e 5000x, a superfície articular estava menos uniforme e o tamanho e distribuição dos precipitados proteináceos estavam mais irregulares e mal definidos nos grupos que passaram pelo processo de irrigação articular do que no grupo controle não irrigado, tornando-se progressivamente pior com o decréscimo da temperatura. As diferenças mais notáveis em resposta às diferentes temperaturas de irrigação puderam ser vistas nos espécimes do grupo I, os quais mostraram menos precipitados e, notavelmente,

maiores exposições de fibras colágenas do que os outros dois grupos experimentais e o controle (CHENG et al., 2004).

Em estudo experimental *in vitro*, Kocaoglu et al. (2011) avaliaram a taxa metabólica de fragmentos de cartilagem de 24 suínos jovens submetidos à imersão em solução salina em quatro diferentes temperaturas (4, 24, 32 e 37 °C), durante duas horas. Os métodos de avaliação incluíram a mensuração da quantidade de mRNA e lactato produzidos nos diferentes grupos, além da quantificação de GAGs contidos nos fragmentos após o período de imersão. Os resultados demonstraram que os grupos submetidos às temperaturas mais baixas (4 e 24 °C) produziram menores quantidades de mRNA e lactato, além de apresentarem menores quantidades de GAGs após digestão dos fragmentos cartilagíneos, demonstrando uma diminuição na taxa metabólica celular. Desta forma concluiu-se que a solução salina em temperaturas mais próximas da temperatura intra-articular (32 °C) e corpórea (38 °C) foi menos prejudicial para o metabolismo da cartilagem nos suínos.

Ainda sobre a influência da temperatura da solução de infusão durante a artroscopia, Kim et al. (2009) demonstraram, em estudo randomizado com 50 humanos, divididos em dois grupos que passaram por cirurgia artroscópica do ombro, que aqueles que receberam fluido de infusão à temperatura ambiente tiveram maiores taxas de hipotermia pós-operatória (91,3%) quando comparados com os pacientes que receberam infusão a 37 °C (17,4%).

Porém, um estudo prévio comprovou que pacientes humanos que receberam solução salina à temperatura ambiente durante artroscopias de joelhos, apresentaram diminuição insignificante da temperatura corpórea, sem levar à hipotermia (SÁNCHEZ-INCHAUSTI; VAQUERO-MARTÍN; VIDAL-FERNÁNDEZ, 2005).

A procura por um fluido de irrigação ideal para as artroscopias ainda não foi concluída, basicamente porque os pesquisadores discordam sobre o efeito dos diferentes tipos de soluções de infusão na cartilagem. Achados conflitantes como esses podem ser causados pelas diferenças nos procedimentos cirúrgicos e pelos diferentes tipos e parâmetros dos modelos de avaliação (CHENG et al., 2004).

2.5 MARCADORES INFLAMATÓRIOS

A detecção de pequenas concentrações de citocinas e eicosanóides no líquido sinovial (LS) também pode ser usada como método de avaliação do desequilíbrio bioquímico articular. Tais testes podem oferecer mais vantagens e fornecer indicadores mais sensíveis para o grau e o tipo de doença articular (BERTONE; PALMER; JONES, 2001). As interações entre as três principais citocinas, interleucina-1 (IL-1), IL-6 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), estão intimamente envolvidas no metabolismo sinovial e na artrite, e são comumente associados com a estimulação da degradação da matriz da cartilagem articular (KANDEL et al., 1990; MAY; HOOKE; LEES, 1992; SAKLATVALA, 1986).

Ambas as citocinas IL-1 e TNF- α em contato com os condrócitos ativam a produção e liberação de metaloproteases (MMPs) que, por sua vez, destroem a matriz extracelular da cartilagem (GOLDRING, 2000). Bertone, Palmer e Jones (2001), em trabalho avaliando várias citocinas e eicosanóides encontrados no LS para o diagnóstico de doença articular ou categorias da doença articular em equinos, identificaram IL-1 e TNF- α como bons marcadores de doença articular, e IL-6 e PGE₂ como excelentes marcadores de qualquer doença articular aguda.

Estudo utilizando cultura de cartilagem de humanos com OA comprovou que, na presença de antagonistas da IL-1 e do TNF- α , isoladamente ou em combinação, houve diminuição significativa da degradação de colágeno do tipo II e da liberação de GAGs no meio de cultura quando comparados com cultura de cartilagem sem adição de antagonistas, indicando assim, que a neutralização do TNF- α pode ter efeito condroprotetor em cultura de cartilagem, além de ser tão eficiente quanto a utilização do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) no controle da degradação da cartilagem (KOBAYASHI et al., 2005).

Outros estudos, agora utilizando culturas de condrócitos e sinoviócitos de cavalos, mostraram que a IL-1 β recombinante de humano foi capaz de estimular a produção de PGE₂, IL-1 β , IL-6 e IL-8 de forma significativa e ainda diminuiu a produção de PGs pelos condrócitos, mostrando sua importância como um indutor de inflamação quando em contato com condrócitos e sinoviócitos *in vitro* (BIRD et al., 1997; DAVID et al., 2007; MAY; HOOKE; LEES, 1992).

Na busca do entendimento do comportamento da PGE_2 em cavalos com doença articular, vários pesquisadores, utilizando o modelo de reação inflamatória articular aguda através de infiltração de endotoxina de parede celular de bactéria Gram - (LPS), perceberam que ocorria um pico na produção da citocina às 4, 8 ou 12 horas (GRAUW; LEST; WEEREN, 2009; LUCIA et al., 2013; ROSS et al., 2012) após a injeção do LPS, comprovando, dessa forma, que a PGE_2 é um bom marcador de inflamação local aguda. Em todos os casos foram injetados 0,5 ng de LPS nas articulações intercárpicas de equinos sadios. O decréscimo das concentrações sinoviais de PGE_2 foi gradual, chegando próximo das concentrações basais entre 24 e 48 horas após os tratamentos.

Diante disso, muito tem sido feito na busca por medicamentos capazes de diminuir as concentrações de PGE_2 no meio articular, e assim reduzir seus efeitos deletérios (GRAUW et al., 2014; GRAUW; LEST; WEEREN, 2009). Através da cromatografia de alto desempenho, Grauw, Lest e Weeren (2011) identificaram mais de 20 mediadores lipídicos da inflamação no LS de equinos com artrite induzida por LPS. Nesse estudo os animais tratados com 0,6 mg/kg de meloxicam por via oral tiveram uma redução nas concentrações de PGE_2 no LS às 8, 24 e 168 horas após a indução da inflamação, quando comparados com o grupo placebo, demonstrando a capacidade deste anti-inflamatório no controle de mediadores lipídicos da inflamação articular.

Quando se trata da detecção de $TNF-\alpha$ no líquido sinovial de equinos naturalmente acometidos com doença articular, alguns estudos mostram que a presença deste marcador é inconstante no que diz respeito ao tipo de lesão articular presente (BILLINGHURST; FRETZ; GORDON, 1995; JOUGLIN et al., 2000; LEY et al., 2007) e apenas os animais com fraturas articulares maiores foram detectados com presença significativamente maior do marcador no líquido articular (BILLINGHURST; FRETZ; GORDON, 1995).

Porém, Kamm, Nixon e Witte (2010), estudando a expressão gênica de marcadores inflamatórios, anabólicos e de degradação da cartilagem articular, demonstraram que, apesar de aumentado significativamente no LS apenas em animais com OA severa na articulação do carpo, a expressão do $TNF-\alpha$ na membrana sinovial e cartilagem foi mais consistente quando comparada à expressão de $IL1-\beta$ em todos os graus de OA. Mais uma vez indicando a importância

desta citocina no estudo de doenças inflamatórias articulares (KAMM; NIXON; WITTE, 2010).

Outro método utilizado para avaliar o metabolismo articular é através da quantificação dos GAGs presentes no LS (BOOM et al., 2010; CATTERALL et al., 2010; FRISBIE et al., 2008; MACHADO et al., 2012). Em cavalos de polo avaliados durante um ano, pesquisadores identificaram que os animais que desenvolveram sinais de OA até 24 meses após o fim da temporada, já apresentavam aumento significativo nas concentrações de CS no LS ao término do experimento, quando comparados aos animais que não desenvolveram doença articular (BACCARIN et al., 2014).

O mesmo grupo de pesquisa, agora trabalhando com pacientes submetidos a procedimento artroscópico para retirada de fragmentos osteocondrais (osteocondrite dissecante), demonstrou que as concentrações de CS no líquido sinovial estavam aumentadas mesmo naqueles animais que não apresentavam alterações clínicas em consequência da doença (MACHADO et al., 2012), comprovando a importância deste GAG como marcador de doença articular.

O AH é uma molécula de alto peso molecular e exerce grande importância no processo de lubrificação do ambiente articular, sendo produzido na sua maioria por células similares a fibroblastos, denominadas “sinoviócitos tipo B” (ENGSTRÖM-LAURENT, 1997). Estudando a relação do AH e do CS, David-Raoudi et al. (2009) mostraram que sinoviócitos tipo B de humanos *in vitro*, quando em contato com o CS, aumentavam a expressão gênica de enzimas precursoras do AH (ácido hialurônico sintase tipos 1 e 2), demonstrando assim que o AH está diretamente relacionado com o CS, que é um excelente biomarcador de doença inflamatória (BACCARIN et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar da avaliação de infusão articular de soluções a diferentes temperaturas ter maior importância em casos de doença inflamatória, faz-se necessário conhecer a reação dos tecidos articulares normais a tais condições, ou seja, conhecer a segurança do método antes de avaliar sua eficácia clínica. Diante disso, foram utilizados dois modelos animais, utilizando-se ovinos e equinos sem doença articular prévia, para avaliação da infusão articular de Ringer com lactato a diferentes temperaturas durante procedimentos artroscópicos. Os resultados obtidos poderão ser extrapolados para utilização tanto em humanos quanto em equinos, que também sofrem rotineiramente de osteoartrite.

4 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes temperaturas do fluido de infusão articular utilizado nas artroscopias, através de uma experimentação utilizando-se primeiramente quatro grupos (5, 12, 25 e 38 °C) de seis articulações de ovinos, e posteriormente três grupos (5, 25 e 38°C) de quatro articulações de equinos, sendo para isso avaliadas:

- Variações das temperaturas articular e retal durante os procedimentos cirúrgicos;
- Características da ultraestrutura de superfície da cartilagem articular antes e após a irrigação;
- Características microscópicas da membrana sinovial antes e após a irrigação;
- Presença de biomarcadores de doença articular no período pós-operatório para os grupos de equinos.

5 MATERIAL E MÉTODO

Neste trabalho inicialmente foram utilizadas 24 articulações femoropatellares de 12 ovinos (divididas em quatro grupos de seis articulações), que passaram por procedimento artroscópico para infusão de fluido a quatro diferentes temperaturas (5, 12, 25 e 38 °C), totalizando uma hora de irrigação. Após avaliação histológica da membrana sinovial e da ultraestrutura de superfície da cartilagem articular por MEV, nos tempos T0 (imediatamente antes do início da infusão) e T1 (após uma hora de infusão), três temperaturas foram escolhidas para utilização em 12 articulações radiocárpicas de seis equinos (divididas em três grupos de quatro articulações), sob o mesmo protocolo. Nos equinos, como avaliações complementares, foram mensuradas as concentrações de marcadores inflamatórios (IL-1 β , PGE₂ e TNF- α) e de metabolismo (CS e AH) presentes no LS no período pós-operatório.

5.1 CONTROLE DA TEMPERATURA

Para condicionamento do RL que foi utilizado para lavagem articular durante as artroscopias, uma câmara incubadora do tipo B.O.D.¹ com temperatura interna regulável de -10 a 60 °C foi utilizada (Figura 3). Os frascos de soro foram armazenados na câmara seis horas antes do início das artroscopias, tempo suficiente para regularização da temperatura da incubadora e do líquido contido em cada frasco de 1 litro da solução de RL.

¹ Incubadora refrigerada tipo B.O.D. – SPLabor, Brasil.

Figura 3 – Câmara de incubação tipo B.O.D. para condicionamento dos frascos de RL, a temperatura controlada, que foram utilizados durante as artroscopias

Fonte: Serviço de Cirurgia de Grandes Animais (SCGA)/FMVZ/USP

A câmara é de compartimento único e, portanto, capaz de manter apenas uma temperatura por ciclo. Desta forma, para otimização do tempo cirúrgico, as articulações direita e esquerda de cada animal participaram sempre do mesmo grupo. Assim, apesar da unidade experimental ser articulação, tabulamos os grupos por animais, e não por articulação de cada animal, conforme Tabelas 1 e 2.

Todos os animais envolvidos neste projeto tiveram as temperaturas articular e retal monitoradas durante o procedimento cirúrgico. Para isso foi utilizado um termômetro registrador do tipo *datalogger*² de duplo canal capaz de atualizar as temperaturas retal e articular a cada um segundo (Figura 4). O registrador foi programado para registrar as temperaturas a cada um minuto em sua memória e os dados obtidos foram tabelados.

² Termômetro registrador *datalogger* – KIMO, Brasil.

Figura 4 – Termômetro registrador utilizado para mensuração das temperaturas retal e articular durante procedimento artroscópico

Fonte: SCGA/FMVZ/USP

Nota: 1) registrador; 2) probe intra-articular; 3) probe retal.

5.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

5.2.1 Ovinos

Na primeira etapa deste trabalho foram utilizadas 24 articulações femoropatellares de 12 ovinos sadios, dos quais sete eram fêmeas e cinco machos, com idade variando de um ano e dois meses a um ano e quatro meses e pesando entre 28 e 54 kg. As articulações foram divididas em quatro grupos de seis e passaram por procedimento artroscópico para serem lavadas com solução de RL, sob temperatura controlada, durante uma hora. Foram utilizadas as temperaturas 5, 12, 25 e 38 °C e as alterações causadas nos diferentes grupos foram avaliadas

através de biopsia osteocondral e de membrana sinovial imediatamente após o início do procedimento cirúrgico e ao término da lavagem articular.

Tabela 1 – Relação dos ovinos e apresentação quanto ao peso, gênero e o grupo a que foram aleatoriamente incluídos

OVINO	PESO kg	GÊNERO	GRUPO °C
111	54	M	12
112	28,5	F	25
113	30,5	M	25
115	41	F	25
116	31,5	F	38
117	39	M	38
118	37	F	5
122	39	F	12
123	30	F	12
124	45	M	5
126	45	M	38
Pirata	38	F	5

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Os animais foram avaliados através de exame físico geral e articular; avaliação radiográfica e ultrassonográfica das articulações em estudo; e hemograma. Nenhum animal apresentou alterações e antes do início do experimento passaram por um período de 15 dias de adaptação.

Os ovinos foram submetidos a jejum alimentar de 48 horas e hídrico de 24 horas. Para antibioticoprofilaxia foi administrado enrofloxacin³ 5,0 mg/kg, e como medicação anti-inflamatória o cetoprofeno⁴ 1,0 mg/kg, ambos por via intravenosa, 30 a 60 minutos previamente ao procedimento cirúrgico. Além disso, ainda foram avaliados os parâmetros fisiológicos de cada ovino antes do início do experimento.

Os animais foram medicados com xilazina⁵ (0,03mg/kg) pela via intravenosa. Após aproximadamente 10 minutos foi realizada a administração de propofol⁶ (5

³ Baytril – Bayer, Brasil.

⁴ Ketofen – Merial, Brasil.

⁵ Rompun – Bayer, Brasil.

⁶ Propovan – Cristália, Brasil.

mg/kg) pela via intravenosa e os animais foram posicionados em decúbito esternal e intubados com sonda endotraqueal (8 a 10mm) com a ajuda de laringoscópio com lâmina reta. Após a conexão da sonda ao circuito anestésico, os animais receberam pela via inalatória isoflurano⁷ na concentração de 2 a 3% diluído em oxigênio a 70% e ventilados mecanicamente. Durante o procedimento cirúrgico os ovinos receberam infusão contínua de lidocaína⁸ e cetamina⁹ para analgesia transoperatória e foram monitorados para frequência e ritmo cardíacos, pressão arterial invasiva, volume corrente, volume minuto, tensão de dióxido de carbono ao fim da expiração e concentração de gases anestésicos. A taxa de fluidoterapia instituída durante o procedimento foi de 5 a 10 ml/kg de solução RL.

Para realização da artroscopia os ovinos foram posicionados em decúbito dorsal com auxílio de calha, os membros pélvicos fixados em sua extremidade distal a uma barra vertical à mesa cirúrgica, mantendo a articulação femoropatelar em extensão. Foi realizada antissepsia das regiões de ambas as articulações femoropatelares com solução degermante de clorexidina, seguida de antissepsia com solução hidroalcoólica de clorexidina e montagem de campo operatório pelo cirurgião, seguindo os procedimentos de rotina do SCGA/FMVZ/USP.

O instrumental artroscópico (cânula, obturador, cânula de fluxo, ótica, *punchs* e pinças de biopsia) foi submetido à desinfecção em glutaraldeído por 30 minutos e a câmera protegida com capa plástica de artroscopia, estéril.

Para dar início à cirurgia fez-se uma incisão de aproximadamente 1 cm na região infrapatelar, medial ao ligamento tibiopatelar, para introdução do conjunto cânula-obturador de 6mm de diâmetro na articulação. O conjunto foi direcionado pelo sulco intertroclear, passando sob a patela, até sua extremidade ser visualizada na região suprapatelar lateral, onde outra incisão de pele e cápsula articular foi realizada para exteriorização do instrumento. O obturador foi retirado e uma ótica artroscópica 2,7mm 30°¹⁰, acoplada em sua cânula, foi posicionada dentro da cânula de 6mm e introduzida completamente. Posteriormente, a camisa de 6mm foi retraída e retirada da articulação, ficando a ótica de 2,7mm posicionada no sulco troclear sob a patela, mostrando a porção distal das trócleas lateral e medial do fêmur. Nesse momento uma cânula de lavagem de 4mm foi introduzida no primeiro portal e

⁷ Isoforine – Cristalia, Brasil.

⁸ Cloridrato de Lidocaína – União Química, Brasil.

⁹ Dopalen – Vetbrands, Brasil.

¹⁰ Karl Storz – Alemanha.

direcionada medialmente à tróclea medial, servindo de guia para manutenção de um probe de monitoramento de temperatura durante todo o procedimento cirúrgico. Um terceiro portal foi aberto na região infrapatelar, lateral ao ligamento tibiopatelar, para realização das biopsias osteocondrais e de membrana sinovial (Figura 5).

Figura 5 – Sequência de imagens demonstrando as etapas da técnica cirúrgica empregada para realização de artroscopia femoropatelar em ovinos

Fonte: SCGA/FMVZ/USP

Nota: a) posicionamento de um ovino em decúbito dorsal com os membros estendidos e fixados à barra vertical; b) campos operatórios isolados; c) incisão de pele para abertura do primeiro portal; d) introdução da camisa-obturador 6mm na articulação; e) posicionamento sob a patela do conjunto e abertura do segundo portal; f) posicionamento da ótica 2,7mm/cânula no interior da camisa de 6mm; g) posicionamento da cânula de lavagem no recesso medial da articulação; h) introdução do probe de monitoramento da temperatura.

Para realização das biopsias osteocondrais nos ovinos foram utilizados *punchs* metálicos de 4mm desenvolvidos para realização de biopsias de pele. A resistência e lâmina de corte foram suficientes para utilização em tecido osteocartilaginoso dos ovinos (Figura 6).

Figura 6 – Sequência de imagens demonstrando o instrumento utilizado e a realização de biopsia osteocondral por artroscopia em um ovino

Fonte: SCGA/FMVZ/USP

Nota: a) *punch* metálico de 4mm utilizado para realização da biopsia osteocondral; b) introdução da lâmina de corte no osso subcondral com utilização de martelo ortopédico; c) fragmento osteocondral sendo retirado da articulação dentro do *punch*.

O sistema de irrigação articular utilizado foi por gravidade. A pressão de entrada do líquido na articulação dos ovinos variou de 53 a 61 mmHg durante todos os procedimentos cirúrgicos.

5.2.2 Equinos

Na segunda etapa deste trabalho foram utilizadas 12 articulações radiocárpicas de seis equinos hígidos, fêmeas, com idade variando de 7 a 10 anos e pesando

entre 324 e 401 kg. As articulações foram divididas em três grupos de quatro e passaram por procedimento artroscópico para serem lavadas com solução de RL sob temperatura controlada durante uma hora. Foram utilizadas as temperaturas 5, 25 e 38 °C e as alterações causadas nos diferentes grupos foram avaliadas através de biopsia osteocondral e de membrana sinovial, imediatamente após o início do procedimento cirúrgico e ao término da lavagem. Além disso, o LS das articulações de equinos envolvidas no projeto foi coletado antes do início do procedimento cirúrgico (0 hora) e 12, 24 e 48 horas após o término da lavagem articular para análise em laboratório e determinação das concentrações de PGE2, IL1 β , TNF α , CS e AH.

Tabela 2 – Relação dos equinos utilizados e apresentação quanto ao peso, gênero e o grupo a que foram aleatoriamente incluídos

EQUINO	PESO kg	GÊNERO	GRUPO °C
1	390	F	5
2	354	F	5
3	324	F	25
4	360	F	25
5	338	F	38
6	401	F	38

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Os animais foram avaliados através de exame físico geral e exame de claudicação; avaliação radiográfica e ultrassonográfica das articulações em estudo; e hemograma. Nenhum dos animais utilizados nesta etapa possuía alterações e permaneceram por um período de 15 dias de adaptação primariamente a qualquer procedimento.

Os equinos foram submetidos somente a jejum alimentar de 12 horas e foi administrado amicacina 15mg/kg como antibioticoprofilaxia por via intravenosa, 30 a 60 minutos antes do início do procedimento, além de avaliados os parâmetros fisiológicos.

Os equinos não receberam tratamento anti-inflamatório antes ou após o procedimento cirúrgico, uma vez que a avaliação das citocinas inflamatórias presentes no LS é influenciada pelo uso de tais medicamentos (GRAUW et al.,

2014), sendo esse um dos objetos de avaliação do presente trabalho. Para controle da dor, quando presente, foi utilizado tramadol 3 mg/kg pela via intravenosa a cada 8 horas, diluído em um litro de solução fisiológica.

Os animais receberam como medicação pré anestésica xilazina¹¹ (0,6 mg/Kg, IV) e 15 minutos depois induzidos com cetamina¹² (2,2 mg/Kg, IV) associada a diazepam¹³ (0,05 mg/Kg, IV) e Éter Gliceril Guaiacol 10%¹⁴ (100 mg/Kg, IV). Após a intubação com sonda orotraqueal de 26 mm de diâmetro interno, os animais foram posicionados em decúbito dorsal na mesa de cirurgia. O plano anestésico foi mantido com isoflurano¹⁵ e 70% de fração de oxigênio inspirado. Os animais foram conectados ao aparelho de ventilação para grandes animais¹⁶ em circuito fechado e submetidos à ventilação com volume controlado de 14 ml/kg, frequência respiratória de 7 mpm e relação inspiração:expiração de 1:3.

No período trans-anestésico foi instituído fluidoterapia IV com solução de RL na taxa de 10 ml/kg/hora e quando a pressão arterial média (PAM) apresentou-se abaixo de 60 mmHg foi administrado sulfato de efedrina¹⁷ na taxa de 0,02 mg/kg/min como terapia de suporte cardiovascular até que a PAM aumentasse para 65 – 70 mmHg.

Como adjuvante da anestesia inalatória, todos os animais receberam infusão contínua de cloridrato de lidocaína¹⁸ na taxa de 0,05 mg/kg/min e *bolus* inicial de 1,3 mg/Kg, para manutenção de melhor analgesia durante o trans-operatório.

O instrumental artroscópico (camisa, obturador, cânula de fluxo, ótica e dispositivos de biopsia) foi submetido à desinfecção com glutaraldeído, por 30 minutos, e a câmera protegida com capa plástica de artroscopia, estéril.

Após anestesiados e posicionados em decúbito dorsal, e antes do início do procedimento artroscópico, as articulações do carpo foram levemente flexionadas até a obtenção de um ângulo de 120° entre os ossos rádio e metacarpo III (Figura 7) e, em seguida, a região foi preparada cirurgicamente com solução degermante de clorexidina, seguida de solução hidroalcoólica para posicionamento dos panos de campo pelo cirurgião, seguindo os procedimentos de rotina do SCGA/FMVZ/USP.

¹¹ Sedomin – Konig, Argentina.

¹² Dopalen – Vetbrands, Brasil.

¹³ Compaz – Cristalia, Brasil.

¹⁴ Éter Gliceril Guaiacol (EGG) - Powervet, Brasil.

¹⁵ Isoforine – Cristalia, Brasil.

¹⁶ Línea C – Intermed, Brasil.

¹⁷ Efedrin – Cristalia, Brasil.

¹⁸ Cloridrato de Lidocaina – União Química, Brasil.

Figura 7 – Posicionamento de um equino em decúbito dorsal, com flexão das articulações do carpo em ângulo de 120°

Fonte: SCGA/FMVZ/USP

Inicialmente realizou-se artrocentese com agulha 40x10, lateralmente ao tendão extensor radial do carpo, para obtenção de amostra de LS, e em seguida fez-se a distensão da articulação radiocárpica com solução de RL. A etapa seguinte compreendeu a abertura do primeiro portal com incisão de pele e cápsula articular de aproximadamente 1 cm, lateral ao tendão extensor radial do carpo, para introdução do conjunto cânula-obturador de 6mm. Após retirada do obturador foi introduzida ótica artroscópica¹⁹ 30° 4mm, para visualização das estruturas intra-

¹⁹ Kärli Storz – Alemanha.

articulares. Um segundo portal foi criado lateral ao tendão extensor digital lateral para posicionamento do probe de monitoramento da temperatura intra-articular, o qual foi mantido durante todo o procedimento cirúrgico. Para realização das biopsias, um terceiro portal de aproximadamente 1,5 cm foi criado medial ao tendão extensor radial do carpo, tomando-se as devidas precauções para que nenhum instrumento tocasse a superfície da cartilagem antes da realização das biopsias (Figura 8). As biopsias de membrana sinovial foram realizadas com pinça artroscópica convencional.

Figura 8 – Imagem demonstrando os três portais criados para artroscopia radiocárpica de equinos

Fonte: SCGA/FMVZ/USP

Nota: Seta menor – primeiro portal (ótica); seta maior – segundo portal (termômetro); cabeça de seta – terceiro portal (biopsias).

O instrumento anteriormente utilizado nos ovinos para biopsia osteocondral foi testado em peças anatômicas de equinos, não apresentando resistência suficiente, impossibilitando a utilização do mesmo. Para esta etapa foi desenvolvido e manufaturado um instrumento metálico inoxidável, com 5mm de diâmetro e resistência suficiente para ser utilizado em tal função (Figura 9).

Figura 9 – Instrumentos utilizados para realização das biopsias osteocondrais dos equinos

Fonte: SCGA/FMVZ/USP

Nota: 1) manípulo para introdução na articulação; 2) ponteiros removíveis; 3) chave utilizada para troca da ponteira; 4) haste utilizada para retirada do fragmento osteocondral do interior da ponteira; 5) base com rosca para fixação da ponteira no momento da retirada do fragmento; martelo ortopédico para introdução da ponteira no osso subcondral.

O sistema de irrigação articular utilizado foi por gravidade. A pressão de entrada do líquido na articulação dos equinos variou de 72 a 81 mmHg durante todos os procedimentos cirúrgicos.

5.3 ANÁLISES LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS

5.3.1 Cartilagem

As biopsias osteocondrais dos ovinos foram coletadas da região do sulco intertroclear femoral (Figura 10) e imediatamente fixadas em paraformaldeído 4%.

Subsequentemente os fragmentos osteocondrais foram desidratados numa série gradual de etanol a 70%, 80%, 90% e 100% e para finalizar o processo de desidratação foram armazenados em estufa a 38 °C durante três horas. Posteriormente os fragmentos foram montados em bases metálicas apropriadas e cobertos com camada de 5nm de ouro²⁰ para serem visualizados em microscópio eletrônico de varredura²¹ nos aumentos de 93x, 929x, 3290x e 7060x.

Figura 10 – Imagem artroscópica demonstrando o posicionamento do *punch* na região do sulco intertroclear do fêmur de um ovino, para retirada de fragmento osteocondral

Fonte: SCGA/FMVZ/USP

Nota: ST – sulco da tróclea; P – *punch*; MS – membrana sinovial.

Durante o processamento das amostras de cartilagem o principal problema encontrado foi a deposição de minerais provenientes, provavelmente, do líquido fixador das amostras, o que provocou uma diminuição das áreas de cartilagem aptas a serem avaliadas sem interferência dos artefatos da técnica. Tais alterações, quando presentes no campo de maior aumento (7060x), foram desconsideradas pelos avaliadores.

As imagens das cartilagens de cada articulação nos momentos T0 e T1 foram dispostas lado a lado e analisadas, por três avaliadores cegos, quanto à delaminação da camada superficial e quanto à exposição de filamentos de colágeno presentes nas camadas mais profundas. Essa avaliação foi feita comparando-se a

²⁰Balzers SCD-040

²¹Leo 435VP – Zeiss, Germany

imagem inicial e a imagem final, sendo atribuídas notas de acordo com as alterações apresentadas na Tabela 3. O somatório das notas atribuídas por cada variável forneceu o escore total de cada articulação e a mediana dos três avaliadores foi tabulada para análise estatística.

Tabela 3 – Escore de avaliação das alterações de superfície da cartilagem articular

	NOTAS			
	ausente 0	discreta 1	intensa 2	
DELAMINAÇÃO				
EXPOSIÇÃO DE FILAMENTOS	ausente 0	filamentos isolados 1	rede discreta 2	rede intensa 3

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nos equinos as biopsias foram feitas na faceta articular do rádio que faz contato com o osso carpo intermédio, topograficamente localizada imediatamente medial ao tendão do músculo extensor radial do carpo (Figura 11).

Figura 11 – Imagens sequenciais da coleta de biopsia do fragmento osteocondral na articulação radiocárpica de um equino

Fonte: SCGA/FMVZ/USP

Nota: a) introdução do instrumento de biopsia no meio articular; b) escolha da superfície articular para posicionamento da lâmina de corte; c) introdução da ponteira até a marca de 5mm (seta); d) local de retirada do fragmento osteocondral da articulação.

Para evitar as deposições minerais encontradas nas superfícies articulares dos ovinos, as biopsias de cartilagem dos equinos foram fixadas por imersão em glutaraldeído 2,5% durante 3 dias, lavadas com água destilada em lavadora ultrassônica e em seguida desidratadas em série crescente de álcool (60% ao absoluto). A conclusão do processo de desidratação desta vez foi feita com imersão em solução de acetato de isoamila 3h à 4°C, e secas em aparelho ponto crítico²² utilizando CO₂ líquido. As amostras foram montadas em bases metálicas apropriadas e cobertas com íons de ouro²³ e examinadas em microscópio eletrônico de varredura²⁴. O método de avaliação foi o mesmo descrito anteriormente para os ovinos.

²²Balzers CPD-30

²³Balzers SCD-040

²⁴Leo 435VP – Zeiss, Germany

Antes da análise das imagens de MEV da superfície articular dos ovinos e equinos envolvidos nesse trabalho, um projeto-piloto foi realizado para processamento de amostras osteocondrais de equino, com intuito de evidenciar o aspecto normal da superfície articular, assim como o aspecto após remoção química da camada superficial e consequente exposição de fibras de colágeno, possibilitando assim melhor análise das possíveis alterações da lavagem articular na ultraestrutura da superfície da cartilagem. Para isso um equino foi submetido a artroscopia, simulando o método que seria utilizado durante o experimento, e duas amostras de cartilagem pré lavagem (T0) e uma pós lavagem articular (T1) foram colhidas para análise por MEV. Uma das amostras do momento T0 foi incubada por duas horas em solução de PBS contendo uma unidade de medida de Condroitinase AC para digestão da camada mais superficial da cartilagem e demonstração da rede de fibras de colágeno presente nas camadas imediatamente abaixo (JURVELIN *et al.*, 1996). Após o período de incubação, a amostra digerida, a segunda amostra do T0 e a amostra do T1, foram processadas conforme descrição acima para visualização por MEV (Figuras 12 a 14).

Figura 12 – Superfície da cartilagem articular de equino, antes do início da lavagem articular com Ringer com lactato, visualizada por microscopia eletrônica de varredura

Fonte: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres/FMVZ/USP

Nota: Superfície lisa, com escassos pontos brancos de precipitação e pequena irregularidade (seta). Aumento 7000x.

Figura 13 – Imagem da ultraestrutura da superfície da cartilagem articular de equino submetida a digestão por Condroitinase AC por duas horas

Fonte: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres/FMVZ/USP

Nota: Presença de intensa rede de filamentos (fibras de colágeno) evidenciada após a digestão da camada de proteoglicanos antes sobreposta. Aumento 7000x.

Figura 14 – Ultraestrutura da superfície articular de equino submetido a lavagem da articulação radiocárpica com Ringer com lactato a 5 °C durante uma hora

Fonte: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres/FMVZ/USP

Nota: Em alguns pontos do campo de visão a camada mais superficial da cartilagem foi mantida (setas menores) e em outros, parcialmente removida pela lavagem, demonstrando as fibras de colágeno da camada justaposta (seta maior). Aumento 7000x.

5.3.2 Membrana sinovial

As biopsias de membrana sinovial foram realizadas com pinça goiva em ambas as etapas do experimento e os locais escolhidos do ambiente articular para a coleta foram aqueles onde as vilosidades sinoviais eram mais evidentes (Figura 15). As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% imediatamente após serem retiradas da articulação e depois desidratadas em solução crescente de etanol, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 3μm foram realizados em

micrótomo²⁵, sendo posteriormente corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica. As amostras (2 cortes por animal) foram avaliadas sob microscopia óptica por um pesquisador que não tinha as informações quanto às condições e momentos experimentais. Com o auxílio de um Fotomicroscópio²⁶ acoplado a um programa de análise de imagem²⁷, foram obtidas fotomicrografias das lâminas coradas por HE. As lâminas foram analisadas qualitativamente quanto à presença de edema, fibrose, infiltrado inflamatório e hemorragia.

Figura 15 – Pinça goiva sendo utilizada para apreensão e corte da membrana sinovial durante artroscopia em um equino

Fonte: SCGA/FMVZ/USP

²⁵ Hyrax M60 – Zeiss, Alemanha.

²⁶ Olympus – Japão.

²⁷ ImagePro Plus – versão 7.0

5.3.3 Líquido sinovial

As amostras de LS foram coletadas de todas as articulações de equinos imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico (0 hora) e 12, 24 e 48 horas após o término da lavagem com a solução de RL sob temperatura controlada (Figura 16). As amostras foram centrifugadas em microtubos sem anticoagulante durante 15 minutos, força relativa de 2000 giros, em centrífuga refrigerada a 4 °C e o sobrenadante armazenado a -80 °C para posterior análise laboratorial.

Figura 16 – Imagens da coletas de líquido sinovial, antes e após procedimento artroscópico em equino

Fonte: SCGA/FMVZ/USP

Nota: Coleta antes do início do procedimento cirúrgico (a) e 24 horas após o término da lavagem articular (b).

5.3.3.1 Determinação das concentrações de ureia no líquido sinovial

As concentrações de citocinas e GAGs no LS estão sujeitas a diluições. Isso acontece dependendo dos graus de distensão articular (efusão) e de hidratação do animal ou quando a aspiração de líquido articular é improdutiva e a articulação precisa ser lavada para coleta de amostra. Nessas ocasiões pode-se usar a concentração de ureia no LS como fator de correção, visto que é uma molécula não produzida tampouco metabolizada no ambiente articular (KRAUS et al., 2002, 2007).

Desta forma, as concentrações de PGE₂, IL-1 β , TNF- α , CS e AH das amostras foram divididas pela concentração de ureia do líquido sinovial em cada momento de coleta para correção dos valores.

Para quantificação da ureia, uma alíquota de cada amostra de líquido sinovial coletada durante o experimento foi descongelada e a concentração mensurada em analisador bioquímico automático²⁸.

5.3.3.2 Determinação das concentrações de PGE₂ no líquido sinovial

Para quantificação de PGE₂ no LS, foi realizado o método ELISA, com o *kit* adquirido da empresa Cayman Chemical Company (EUA). O LS utilizado estava acondicionado em microtubos sem anticoagulante, à temperatura de -80°C. Após pipetagem da curva padrão foram adicionados 50 μ L da amostra em duplicata em cada poço previamente sensibilizado com anticorpo anti-IgG de rato. Em seguida foram adicionados 50 μ L do conjugado PGE₂-acetilcolinesterase e 50 μ L de anticorpo monoclonal de PGE₂. O método utilizado foi um ensaio baseado na competição entre PGE₂ e um conjugado de PGE₂-acetilcolinesterase (PGE tracer) por uma quantidade limitada de anti-corpo monoclonal de PGE₂. O conjugado PGE₂-acetilcolinesterase é constante, enquanto que a concentração de PGE₂ variou de acordo com a amostra. Portanto, a concentração de conjugado disponível para ligar ao anticorpo monoclonal de PGE₂ foi inversamente proporcional à concentração de PGE₂ na amostra. Esse complexo PGE₂-anticorpo ligou-se ao anticorpo policlonal de caprino anti-IgG de rato que já estavam nos poços da placa. Após incubação de 14 horas a 4°C a placa foi então lavada e 100 μ L de reagente Ellman (que contém substrato para acetilcolinesterase) foi adicionado ao meio. Após incubação de 60 a 90 minutos em proteção da luz, o reagente se ligou ao conjugado formando uma reação enzimática com coloração amarela, que foi lida à 412nm em leitor de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 9,11 a 936,82 pg/mL.

²⁸ Randox RX Daytona

5.3.3.3 Determinação das concentrações de IL-1 β no líquido sinovial

Para a quantificação da IL-1 β utilizou-se 100 μ L de líquido sinovial acondicionado em microtubos sem anticoagulante, à temperatura de -80°C. O método utilizado para dosagem foi o ELISA *sandwich* (Uscn Life Science®) para equinos. Foram adicionados 100 μ L de padrão, branco e das amostras em duplicata aos poços da placa, já sensibilizada com o anticorpo específico para IL-1 β de equino, e esta foi incubada por duas horas a 37°C. Após incubação, o líquido foi removido e então adicionados 100 μ L de reagente de detecção (avidina com peroxidase) em cada poço. Após incubação por uma hora a 37°C, o líquido foi aspirado e a placa lavada por três vezes com solução de lavagem diluída em água ultrafiltrada. Adicionou-se 100 μ L de outro reagente de detecção e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. A placa então foi lavada por cinco vezes e adicionou-se 90 μ L de solução de substrato a cada poço e a placa foi incubada a 37°C por 20 minutos, protegida da luz. Apenas os poços contendo anticorpos biotina-conjugado e avidina-conjugado sofreram alteração de cor com o substrato. Por fim, adicionou-se 50 μ L de solução de ácido sulfúrico para parar a reação entre enzima-substrato e a absorbância foi lida em 450nm em leitor de ELISA6 correlacionada à concentração pelo uso de curva padrão com variação de 15.92 a 500,0 pg/mL. Foram utilizadas duas amostras de LS de articulações com artrite séptica para validação do teste.

5.3.3.4 Determinação das concentrações do TNF- α no líquido sinovial

O método utilizado para quantificar TNF- α no LS foi o ELISA *sandwich*, com o *kit Equine TNF alfa duo set* obtido da R&D systems®. A placa foi sensibilizada com anticorpo anti-TNF- α equino e incubada *over night* em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes e recebeu solução para bloquear a reação. Após incubação por uma hora à temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada e adicionou-se 100 μ L das amostras padrão e das amostras a serem analisadas. A placa foi novamente incubada por duas horas à temperatura ambiente

e lavada três vezes. Adicionou-se então 100µL de anticorpo de detecção em cada poço. Após incubação por duas horas, a placa foi novamente lavada e 100µL de estreptavidina peroxidase foram adicionados em cada poço. Após incubação por 20 minutos, protegida da luz, adicionou-se solução substrato e após 20 minutos, a solução para parar a reação. A placa foi lida a 450nm em leitor de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 19,9 a 1002,9 pg/mL.

5.3.3.5 Determinação das concentrações de GAGs no líquido sinovial

Para determinação de GAGs no LS, 30µL da amostra acondicionada em microtubos sem anticoagulante, a -80 °C, foi incubada com 60µL de protease alcalina P126 maxatase (4mg/mL Tris HCl 0,05M pH 8,0), *overnight* em banho-maria a 50 °C. A maxatase foi então inativada por aquecimento (100 °C por 15 minutos). Os resíduos insolúveis foram removidos por centrifugação e o sobrenadante foi coletado e seco a vácuo em uma centrífuga à vácuo por uma hora e trinta minutos a 45 °C. As amostras foram ressuspensas em 15µL de água destilada. Alíquotas destas amostras (5µL) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,05%, em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05M, pH 9,0 (PDA), em cuba refrigerada, por aproximadamente uma hora. Foram adicionados à cada lâmina dois padrões, sendo um de condroitim sulfato (CS) (1mg/ml) e outro de ácido hialurônico (AH) (1mg/ml). Na eletroforese em gel de agarose, tampão PDA, os GAGs são separados pela capacidade de interação com a diamina. Os compostos que menos interagem com 1,3-diaminopropano apresentam maior migração eletroforética. Após a eletroforese, o AH e o CS foram fixados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1%, por 2 horas, no mínimo. A seguir o gel foi recoberto com papel de 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 5,0 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M. As lâminas foram digitalizadas e as

imagens editadas para análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas (Figura 17).

Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose dos GAGs presentes no LS de articulações lavadas durante uma hora com solução de Ringer lactato a 5 °C

Fonte: Departamento de Clínica Médica/FMVZ/USP

Nota: Na lâmina estão representadas amostras do LS de ambas as articulações de um mesmo equino coletadas nos quatro momentos (0,12, 24 e 48 horas). AH: padrão ácido hialurônico.

CS: padrão condroitim sulfato.

6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Na comparação das variáveis: superfície articular, temperaturas retais e articulares entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Já para a comparação dois a dois dentro de um mesmo grupo, quando necessário, foi utilizado o teste de Wilcoxon (HOLLANDER; WOLFE, 1973).

Para a análise dos dados referentes às concentrações dos marcadores inflamatórios PGE₂, IL-1 β , TNF- α , CS e AH, foram utilizadas técnicas de análise de variância não paramétrica para medidas repetidas (BRUNNER; PURI, 2001). Assim, foi possível comparar os três grupos (5, 25 e 38 °C) ao longo dos quatro momentos de acompanhamento (0, 12, 24 e 48 horas) para as variáveis determinadas na segunda etapa do trabalho. Os resultados do modelo são apresentados com a tabela de análise de variância (ANOVA) para os efeitos simples de momento e temperatura e o efeito de interação entre eles (para avaliar se o efeito no tempo é diferente dependendo da temperatura). As diferenças entre os momentos fixando-se as temperaturas, e as diferenças entre as temperaturas fixando-se os momentos estão representadas na forma de letras minúsculas e maiúsculas, respectivamente, sobrepostas aos efeitos relativos de tratamento.

Para cada variável apresenta-se uma tabela com estatísticas descritivas, um gráfico de intervalos de confiança para a média das medidas de cada grupo em cada momento fixado e um gráfico de intervalos de confiança para o efeito de tratamento relativo.

Nas tabelas com as estatísticas descritivas são apresentados os tamanhos amostrais, médias, desvios padrão, postos médios, os efeitos de tratamentos relativos, variância dos efeitos de tratamentos e os limites dos intervalos de confiança com 95% de confiança para os efeitos de tratamentos (L.I. = limite inferior e L.S. = limite superior).

O efeito de tratamento relativo é uma medida baseada nos postos das observações. O posto é a ordem de cada observação em relação às demais para uma variável. Por exemplo, se fossem observados os seguintes resultados: 5, 15 e 8, então os postos seriam, respectivamente, 1, 3 e 2. Ainda, o efeito relativo de tratamento é função da média dos postos de cada combinação de momento e temperatura. Dessa forma, quanto menores são valores e, de forma equivalente, os

postos apresentados por um grupo determinado pela combinação de momento e temperatura, menores são as médias dos postos desse grupo e, conseqüentemente, o efeito relativo de tratamento em relação aos demais grupos (para qualquer combinação de momento e temperatura). Portanto, um efeito relativo de tratamento mais próximo de 1 significa que determinada combinação de momento e temperatura apresentou os maiores valores da variável em estudo e um efeito relativo de tratamento mais próximo de 0 significa que essa determinada combinação apresentou os menores valores em relação aos demais.

A correlação entre os marcadores avaliados foi avaliada por gráficos de dispersão e pelo coeficiente de correlação de Spearman (HOLLANDER; WOLFE, 1973). A análise estatística foi feita no software estatístico R (R Core Team, 2013).

7 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados separadamente para as duas etapas do experimento, sendo seguida a mesma ordem de variáveis avaliadas.

7.1 OVINOS

7.1.1 Monitoramento das temperaturas

7.1.1.1 Temperatura retal

Na tabela 4 são apresentadas estatísticas descritivas da temperatura retal máxima, média e mínima registradas nos diferentes grupos durante uma hora de lavagem articular.

Tabela 4 - Estatística descritiva das temperaturas retais máxima, média e mínima nos quatro grupos de ovinos

	Temperatura	n	Média	Desvio Padrão	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Mínimo	Máximo
Retal Máxima	5	6	36.90	1.12	35.99	36.79	37.62	35.62	38.57
	12	6	36.14	0.91	35.46	36.17	36.92	34.98	37.13
	25	6	35.71	1.14	34.95	35.19	37.02	34.65	37.29
	38	6	36.18	0.93	35.51	36.26	36.94	34.80	37.33
Retal Média	5	6	36.13	1.02	35.22	35.98	37.02	35.09	37.51
	12	6	35.44	0.94	34.88	35.47	36.16	34.13	36.55
	25	6	35.19	1.00	34.35	34.81	36.40	34.29	36.47
	38	6	35.61	0.94	34.78	35.67	36.54	34.29	36.70
Retal Mínima	5	6	35.53	0.89	34.71	35.39	36.48	34.63	36.58
	12	6	34.83	1.03	34.32	34.86	35.79	33.26	35.90
	25	6	34.73	0.86	33.92	34.53	35.70	33.87	35.86
	38	6	35.14	0.93	34.29	35.24	35.97	33.85	36.23

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: "n" número de amostras por grupo.

Considerando as temperaturas retais máxima, média e mínima, não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos. A variação na temperatura corpórea durante o procedimento cirúrgico independe da temperatura do fluido usado para lavagem articular. Note que os p-valores são maiores do que 5% (Tabela 5).

Tabela 5 – Resumo do teste estatístico aplicado às temperaturas retais registradas durante os experimentos em ovinos

	Qui-Quadrado	Graus de Liberdade	P-Valor
Retal Máxima	1.027	3	0.794
Retal Média	3.447	3	0.328
Retal Mínima	2.773	3	0.428

Fonte: (BEZERRA, 2014)

7.1.1.2 Temperatura articular

Na tabela 6 estão apresentadas estatísticas descritivas das temperaturas intra-articulares máxima, média e mínima registradas durante uma hora de irrigação articular com RL a 5, 12, 25 ou 38 °C.

Tabela 6 – Estatística descritiva das temperaturas articulares máxima, média e mínima nos quatro grupos de ovinos

	Temperatura	n	Média	Desvio Padrão	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Mínimo	Máximo
Articular Máxima	5	6	26.60	2.70	23.90	27.07	27.66	23.26	30.64
	12	6	23.41	1.42	22.73	23.47	24.73	21.07	24.97
	25	6	25.10	1.32	24.18	25.04	25.94	23.48	26.91
	38	6	34.24	1.47	33.55	34.85	34.98	31.58	35.64
Articular Média	5	6	14.06	1.29	12.75	13.94 ^a	15.56	12.64	15.57
	12	6	16.95	0.79	16.32	16.93 ^b	17.40	15.96	18.18
	25	6	23.72	0.66	23.44	23.68 ^c	24.33	22.69	24.49
	38	6	32.41	2.07	30.24	33.29 ^d	33.43	29.46	34.74
Articular Mínima	5	6	10.31	1.53	9.38	9.49	11.14	9.29	13.10
	12	6	15.47	0.73	15.08	15.48	15.65	14.44	16.67
	25	6	21.92	0.42	21.63	21.95	22.24	21.32	22.44
	38	6	23.02	3.61	21.10	21.55	22.57	21.05	30.28

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: “n” número de amostras por grupo. Letras diferentes representam diferença estatística.

Considerando as temperaturas articulares, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A temperatura do ambiente articular pôde ser modificada e o sistema de acondicionamento e de irrigação articular foram eficientes para induzir o aquecimento ou resfriamento do ambiente articular. Note que na tabela abaixo os p-valores são menores do que 5% (Tabela 7 e Gráfico 1).

Tabela 7 – Resumo do teste aplicado para comparação das temperaturas articulares nos quatro grupos de ovinos

	Qui-Quadrado	Graus de Liberdade	P-Valor
Articular Máxima	15.989	3	0.001
Articular Mínima	19.517	3	< 0.001
Articular Média	21.600	3	< 0.001

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Gráfico 1 – Gráfico das médias das temperaturas articulares dos ovinos submetidos a lavagem artroscópica com solução de Ringer lactato a 5, 12, 25 e 38 °C

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa.

7.1.2 Cartilagem articular

As amostras osteocondrais foram colhidas no momento T0 e T1 para análise comparativa por três avaliadores cegos. Após determinação dos escores das alterações (Tabela 3) e feita mediana dos três avaliadores, os dados foram comparados estatisticamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Descrição estatística das comparações das notas atribuídas às alterações da ultraestrutura de superfície das cartilagens de ovinos lavadas com Ringer com lactato a 5, 12, 25 ou 38 °C

	Temperatura	n	Média	Desvio Padrão	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Mínimo	Máximo
Cartilagem	5	6	1.50	1.64	0.00	1.00	3.00	0.00	4.00
	12	6	1.50	1.05	1.00	1.50	2.00	0.00	3.00
	25	6	1.25	1.08	0.00	1.50	2.00	0.00	2.50
	38	6	2.17	1.72	1.00	2.00	3.00	0.00	5.00

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: “n” número de amostras por grupo

Para a comparação dos escores das alterações das amostras de cartilagem entre as quatro temperaturas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Assim, não se verificou diferença significativa entre os quatro grupos (p-valor = 0.794) (Tabela 9). Apesar da lavagem articular com solução de RL provocar alterações na ultraestrutura da superfície articular, o grau de alteração independe da temperatura em que o soro foi acondicionado (Figuras 18 e 19).

Tabela 9 – Resumo do teste estatístico aplicado para comparação das alterações de superfície articular nos quatro grupos de ovinos

	Qui-Quadrado	Graus de Liberdade	P-Valor
Cartilagem	1.027	3	0.794

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Figura 18 – Imagem por microscopia eletrônica de varredura da superfície cartilágnea de um ovino antes da irrigação com solução de RL por via artroscópica

Fonte: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres/FMVZ/USP

Nota: Presença de cristas pouco evidentes, alguns pontos brancos (prováveis cristais de Na) e sem depressões ou exposição de filamentos. Aumento 7060x.

Figura 19 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura da mesma articulação visualizada na figura 18, após uma hora de lavagem com RL a 38 °C

Fonte: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres/FMVZ/USP

Nota: A camada mais superficial da cartilagem foi removida nesse campo de visão sendo observados muitos filamentos dispostos em formato de rede (fibras de colágeno).

7.1.3 Membrana sinovial

As amostras de membrana sinovial foram fixadas em paraformaldeído 4% e depois processadas em laboratório para avaliação histológica. Nenhuma amostra de membrana sinovial coletada após a lavagem articular demonstrou mudança no padrão celular e de interstício ou qualquer migração celular decorrente do processo inflamatório que eventualmente a temperatura da solução de infusão pudesse acarretar (Figura 20).

Figura 20 – Fotomicrografia representativa de corte histológico de membrana sinovial de ovino submetido a lavagem articular durante uma hora com RL a 5 °C

Fonte: Departamento de Patologia/FMVZ-USP

Nota: Presença de camada íntima com uma ou duas fileiras de sinoviócitos (seta maior), camada sub-íntima sem edema ou fibrose (cabeça de seta) e presença discreta de vasos sanguíneos (seta menor).

7.2 EQUINOS

7.2.1 Monitoramento das temperaturas

7.2.1.1 Temperatura retal

Na tabela 10 são apresentadas estatísticas descritivas da temperatura retal máxima, média e mínima registradas nos diferentes grupos durante uma hora de lavagem articular.

Tabela 10 – Estatística descritiva das temperaturas retais máxima, média e mínima nos três grupos de equinos

	Temperatura °C	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Retal Máxima	5	4	36.42	0.47	35.92	36.35	37.05
	25	4	36.15	0.31	35.79	36.13	36.54
	38	4	35.98	0.26	35.62	36.04	36.23
Retal Média	5	4	36.24	0.46	35.80	36.14	36.89
	25	4	36.01	0.31	35.64	36.00	36.40
	38	4	35.83	0.27	35.51	35.85	36.13
Retal Mínima	5	4	36.05	0.38	35.70	35.96	36.59
	25	4	35.87	0.28	35.51	35.89	36.19
	38	4	35.67	0.32	35.40	35.62	36.04

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: “n” número de amostras por grupo

Considerando as temperaturas retais máxima, média e mínima, não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os três grupos. A variação na temperatura corpórea durante o procedimento cirúrgico independe da temperatura do fluido usado para lavagem articular. Note que os p-valores são maiores do que 5% (Tabela 11).

Tabela 11 – Resumo do teste aplicado para comparação das temperaturas retais dos grupos 5, 25 e 38 °C

	Qui-Quadrado	Graus de Liberdade	P-Valor
Retal Máxima	2.192	2	0.334
Retal Média	2.192	2	0.334
Retal Mínima	2.007	2	0.367

Fonte: (BEZERRA, 2014)

7.2.1.2 Temperatura articular

Na tabela 12 estão apresentadas estatísticas descritivas das temperaturas intra-articulares máxima, média e mínima registradas durante uma hora de irrigação articular com RL a 5, 25 ou 38 °C.

Tabela 12 – Estatística descritiva das alterações da temperatura articular durante o procedimento cirúrgico nos três grupos de equinos

	Temperatura °C	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Articular Máxima	5	4	25.86	3.61	22.90	24.90	30.75
	25	4	26.66	0.93	25.46	26.74	27.70
	38	4	33.56	1.15	31.98	33.76	34.74
Articular Média	5	4	17.14	3.48	12.94	17.64 ^a	20.34
	25	4	25.37	0.65	24.69	25.27 ^b	26.24
	38	4	31.69	0.84	30.72	31.64 ^c	32.76
Articular Mínima	5	4	13.13	2.80	10.24	12.72	16.84
	25	4	23.79	1.07	22.81	23.63	25.08
	38	4	24.27	0.76	23.34	24.37	24.99

Autor: (BEZERRA, 2014)

Notas: “n” números de amostras por grupo. As letras diferentes representam diferença estatística entre as temperaturas articulares.

Considerando as médias das temperaturas articulares, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A temperatura do ambiente articular pôde ser modificada e o sistema de condicionamento e de irrigação articular foram eficientes no resfriamento ou aquecimento do ambiente articular. Note que o p-valor é menor que 5% (Tabela 14) (Tabela 13 e Gráfico 2).

Tabela 13 – Resumo do teste aplicado para comparação das temperaturas articulares nos três grupos de equinos

	Qui-Quadrado	Graus de Liberdade	P-Valor
Articular Máxima	7.731	2	0.021
Articular Média	9.846	2	0.007
Articular Mínima	7.539	2	0.023

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Gráfico 2 – Gráfico das médias e desvio padrão das temperaturas articulares dos equinos submetidos a lavagem artroscópica da articulação radiocárpica com solução de Ringer lactato a 5, 25 e 38 °C. Letras diferentes significam diferença significativa

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa.

7.2.2 Cartilagem articular

As amostras de cartilagem foram colhidas no momento T0 e T1 para análise comparativa por três avaliadores cegos. Após determinação dos escores das alterações (Tabela 3) e feita mediana das notas dos três avaliadores, os dados foram comparados estatisticamente (Tabela 14).

Tabela 14 – Descrição estatística das notas atribuídas às alterações da ultraestrutura de superfície das cartilagens de equinos lavadas com Ringer com lactato a 5, 25 ou 38 °C

	Temperatura °C	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Cartilagem	5	4	1.25	1.26	0.00	1.00	3.00
	25	4	0.13	0.25	0.00	0.00	0.50
	38	4	1.00	1.41	0.00	0.50	3.00

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: “n” número de amostras por grupo.

Para essa comparação utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e não foi verificada diferença significativa entre os três grupos ($P\text{-Valor} = 0,251$) (Tabela 15). A lavagem articular com solução de RL provocou alterações na ultraestrutura da superfície articular e o grau de alteração independe da temperatura em que a solução foi acondicionado (Figuras 21 e 22).

Tabela 15 – Resumo do teste estatístico aplicado para comparação das medianas das notas atribuídas às alterações de superfície articular nos três grupos

	Qui-Quadrado	Graus de Liberdade	P-Valor
Cartilagem	2.761	2	0.251

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Figura 21 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície cartilaginosa de um equino, antes da irrigação com solução de RL a 38 °C por via artroscópica

Fonte: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres/FMVZ/USP

Nota: Superfície articular rugosa com poucas cristas, sem depressões ou exposição de filamentos. Aumento 329x.

Figura 22 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície cartilágnea de um equino depois da irrigação com solução de RL a 38 °C por via artroscópica durante uma hora

Fonte: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres/FMVZ/USP

Nota: Presença de depressões na superfície da cartilagem e áreas de delaminação mais superficiais, porém sem presença de filamentos de colágeno evidentes. Aumento 329x.

7.2.3 Membrana sinovial

As amostras de membrana sinovial foram fixadas em paraformaldeído 4% e depois processadas em laboratório para avaliação histológica. Nenhuma amostra de membrana sinovial coletada após a lavagem articular demonstrou mudança no padrão celular e de interstício ou qualquer migração celular decorrente do processo inflamatório que eventualmente a temperatura da solução de infusão pudesse acarretar (Figuras 23 e 24).

Figura 23 – Fotomicrografia representativa de corte histológico apresentando membrana sinovial de um equino antes do início da irrigação articular (T0)

Fonte: Departamento de Patologia/FMVZ-USP

Nota: Presença de camada íntima com fileira simples ou dupla de sinoviócitos (seta maior), camada sub-íntima sem edema ou fibrose (seta menor) e presença de vasos sanguíneos (cabeça de seta).

Figura 24 - Fotomicrografia representativa de corte histológico apresentando membrana sinovial da mesma articulação apresentada na figura 23 após uma hora de lavagem articular com solução de RL a 5 °C (T1)

Fonte: Departamento de Patologia/FMVZ-USP

Nota: Presença de camada íntima com fileira simples ou dupla de sinoviócitos (seta maior), camada sub-íntima sem edema ou fibrose (seta menor) e presença de vasos sanguíneos (cabeça de seta).

Nota-se que não houve formação de infiltrados celulares, aumento de vascularização, hiperplasia, edema ou fibrose das camadas mais profundas da membrana sinovial. Uma hora de lavagem com RL não foi capaz de causar alterações morfológicas na membrana sinovial, independente da temperatura utilizada.

7.2.4 Determinação da PGE₂ no líquido sinovial

As amostras de LS dos equinos foram coletadas antes do início do procedimento cirúrgico (0 h) e 12, 24 e 48 horas após a lavagem articular para

determinação das concentrações de PGE_2 . Houve aumento significativo das concentrações de PGE_2 no LS coletado 12 horas após o término da lavagem articular em todos os grupos. Apesar de não haver diferença entre os grupos, houve diminuição nas concentrações entre os momentos 12 e 24 horas para o grupo 25 °C e entre os momentos 12 e 48 horas para o grupo 38 °C, sendo que no grupo 25 °C houve tendência a elevação do momento 24 horas para 48 horas (Tabela 16 e Gráficos 3 e 4).

Tabela 16 – Dados estatísticos das concentrações de PGE_2 no LS de equinos submetidos a três diferentes temperaturas (5, 25 e 38 °C) de lavagem articular durante uma hora nos momentos 0, 12, 24 e 48 horas após o término do procedimento

Temperatura °C	Momento	n	Média	Desvio Padrão	Posto Médio	Efeito Relativo de Tratamento	Variância	L.I.	L.S.
5	0	4	26.78	6.38	4.00	0.07 ^a	0.01	0.05	0.15
5	12	4	3976.07	4818.27	36.00	0.74 ^b	0.23	0.39	0.91
5	24	4	257.43	15.14	27.50	0.56 ^b	0.09	0.39	0.72
5	48	4	983.45	1600.74	26.75	0.55 ^b	0.17	0.32	0.75
25	0	4	70.11	78.10	8.75	0.17 ^a	0.09	0.07	0.43
25	12	4	5657.28	5310.31	37.25	0.77 ^c	0.27	0.36	0.92
25	24	4	234.23	100.87	24.00	0.49 ^b	0.09	0.33	0.65
25	48	4	342.17	213.03	28.25	0.58 ^{bc}	0.07	0.42	0.72
38	0	4	135.69	166.68	15.50	0.31 ^a	0.12	0.16	0.54
38	12	4	3427.37	5585.59	39.25	0.81 ^b	0.06	0.61	0.90
38	24	4	472.07	534.42	27.00	0.55 ^{bc}	0.15	0.33	0.75
38	48	4	336.78	503.08	19.75	0.40 ^{ac}	0.18	0.20	0.65

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa dentro do grupo e letras maiúsculas entre os grupos. “n” número de amostras; L.I. limite inferior; L.S. limite superior.

Gráfico 3 – Demonstração gráfica em linha das médias das concentrações de PGE_2 e os intervalos de confiança 95% no LS nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Gráfico 4 – Demonstração gráfica em linha do efeito relativo de tratamento e os intervalos de confiança 95% no LS nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Quando corrigidos os valores de PGE_2 pelas concentrações de ureia no LS acontece um aumento significativo das concentrações da citocina às 12 horas em todos os grupos, não retornando aos valores basais, apesar da redução nas concentrações. Não houve diferença significativa entre os grupos nos momentos 12, 24 e 48 horas (Tabela 17 e Gráficos 5 e 6).

Tabela 17 – Dados estatísticos dos valores de PGE_2 /Ureia no LS de equinos submetidos a três diferentes temperaturas (5, 25 e 38 °C) de lavagem articular durante uma hora nos momentos 0, 12, 24 e 48 horas após o término do procedimento

Temperatura	Momento	N	Média	Desvio Padrão	Posto Médio	Efeito Relativo de Tratamento	Variância	L.I.	L.S.
5	0	4	1.37	0.25	4.25	0.08 ^{aA}	0.02	0.05	0.28
5	12	3	348.58	304.50	42.00	0.90 ^c	0.01	0.79	0.94
5	24	4	11.42	2.96	27.00	0.58 ^b	0.08	0.41	0.72
5	48	4	46.14	75.68	26.25	0.56 ^b	0.13	0.36	0.74
25	0	4	3.14	3.49	8.75	0.18 ^{aAB}	0.09	0.08	0.44
25	12	4	928.75	1668.87	33.50	0.72 ^c	0.39	0.29	0.91
25	24	4	7.16	2.94	20.00	0.42 ^{bc}	0.06	0.29	0.57
25	48	4	13.57	8.23	26.50	0.57 ^{bc}	0.10	0.38	0.73
38	0	4	6.60	7.96	17.00	0.36 ^{aB}	0.12	0.20	0.57
38	12	4	83.55	134.42	34.75	0.74 ^b	0.11	0.51	0.88
38	24	3	25.09	24.79	28.67	0.61 ^b	0.08	0.44	0.76
38	48	4	24.98	42.88	19.25	0.41 ^{ab}	0.24	0.19	0.69

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa dentro do grupo e letras maiúsculas entre os grupos. “n” número de amostras; L.I. limite inferior; L.S. limite superior.

Gráfico 5 – Demonstração gráfica em linha dos valores de $\text{PGE}_2/\text{Ureia}$ no LS e os intervalos de confiança 95% nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Gráfico 6 – Representação gráfica em linha do efeito relativo de tratamento para os valores de $\text{PGE}_2/\text{Ureia}$ no LS e os intervalos de confiança 95% nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

7.2.5 Determinação da IL-1 β no líquido sinovial

Enquanto às 12 horas as concentrações de IL-1 β no LS do grupo de equinos que tiveram as articulações lavadas com solução a 38 °C não alteraram, nos grupos 5 °C e 25 °C aumentaram significativamente. No grupo 5 °C o pico de concentrações ocorreu 24 horas após o término da irrigação articular, tendendo à normalidade após 48 horas, enquanto que no grupo 25 °C o pico aconteceu às 12 horas, se manteve aumentado às 24 horas e retornaram aos basais após 48 horas (Tabela 18 e Gráficos 7 e 8).

Tabela 18 – Dados estatísticos das concentrações de IL-1 β no LS de equinos submetidos a três diferentes temperaturas (5, 25 e 38 °C) de lavagem articular durante uma hora nos momentos 0, 12, 24 e 48 horas após o término do procedimento

Temperatura	Momento	n	Média	Desvio Padrão	Posto Médio	Efeito Relativo de Tratamento	Variância	L.I.	L.S.
5	0	4	0.00	0.00	15.00	0.30 ^a	0.01	0.24	0.37
5	12	4	6.72	9.48	33.75	0.69 ^{bcA}	0.22	0.38	0.88
5	24	4	7.97	4.16	42.25	0.87 ^c	0.02	0.76	0.92
5	48	4	3.55	5.75	27.25	0.56 ^{ab}	0.24	0.29	0.79
25	0	4	0.00	0.00	15.00	0.30 ^a	0.01	0.24	0.37
25	12	4	2.91	2.66	32.00	0.66 ^{bA}	0.14	0.42	0.82
25	24	4	4.23	5.63	32.50	0.67 ^b	0.19	0.39	0.85
25	48	4	0.59	1.18	20.00	0.41 ^a	0.09	0.25	0.58
38	0	4	0.00	0.00	15.00	0.30 ^a	0.01	0.24	0.37
38	12	4	0.00	0.00	15.00	0.30 ^{aB}	0.01	0.24	0.37
38	24	4	0.92	1.84	20.50	0.42 ^a	0.12	0.25	0.61
38	48	4	1.89	3.54	25.75	0.53 ^a	0.18	0.30	0.74

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa dentro do grupo e letras maiúsculas entre os grupos. “n” número de amostras; L.I. limite inferior; L.S. limite superior.

Gráfico 7 – Demonstração gráfica em linha das médias das concentrações de IL-1 β no LS e os intervalos de confiança 95% nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Gráfico 8 – Demonstração gráfica em linha do efeito relativo de tratamento para o IL-1 β e os intervalos de confiança 95% nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Os valores de IL-1 β /Ureia no grupo 38 °C não sofreram alterações nos diferentes momentos. Nos grupos 5 e 25 °C esses valores aumentaram significativamente às 12 horas, mantiveram-se aumentados na coleta 24 horas após a lavagem articular e tenderam a diminuir às 48 horas. Quando comparados os grupos, os valores de IL-1 β /Ureia na coleta das 12 horas dos grupos 5 e 25 °C foram significativamente maiores que os valores do grupo que as articulações foram irrigadas com fluido a 38 °C. Na coleta das 24 horas os valores de IL-1 β /Ureia foram estatisticamente maiores no grupo 5 °C quando comparados com os valores do grupo 38 °C (Tabela 19 e Gráficos 9 e 10).

Tabela 19 – Dados estatísticos dos valores de IL-1 β /Ureia no LS de equinos submetidos a três diferentes temperaturas (5, 25 e 38 °C) de lavagem articular durante uma hora nos momentos 0, 12, 24 e 48 horas após o término do procedimento

Temperatura	Momento	n	Média	Desvio Padrão	Posto Médio	Efeito Relativo de Tratamento	Variância	L.I.	L.S.
5	0	4	0.00	0.00	14.50	0.30 ^a	0.03	0.22	0.40
5	12	3	1.64	1.88	35.17	0.75 ^{bcA}	0.27	0.37	0.92
5	24	4	0.35	0.23	39.25	0.84 ^{cA}	0.03	0.72	0.91
5	48	4	0.17	0.27	26.00	0.55 ^{ab}	0.17	0.33	0.76
25	0	4	0.00	0.00	14.50	0.30 ^a	0.03	0.22	0.40
25	12	4	0.35	0.57	31.63	0.68 ^{bcA}	0.20	0.39	0.86
25	24	4	0.13	0.16	29.63	0.63 ^{cAB}	0.18	0.38	0.82
25	48	4	0.02	0.05	18.88	0.40 ^{ab}	0.09	0.25	0.57
38	0	4	0.00	0.00	14.50	0.30 ^a	0.03	0.22	0.40
38	12	4	0.00	0.00	14.50	0.30 ^{ab}	0.03	0.22	0.40
38	24	3	0.05	0.09	21.33	0.45 ^{ab}	0.11	0.28	0.64
38	48	4	0.08	0.14	24.50	0.52 ^a	0.16	0.31	0.73

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa dentro do grupo e letras maiúsculas entre os grupos. “n” número de amostras; L.I. limite inferior; L.S. limite superior.

Gráfico 9 – Demonstração gráfica em linha dos valores de IL-1 β /Ureia no líquido sinovial e os intervalos de confiança 95% nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Gráfico 10 – Representação gráfica em linha do efeito relativo de tratamento para os valores de IL-1 β /Ureia no LS e os intervalos de confiança 95% nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

7.2.6 Determinação de TNF- α no líquido sinovial

Não houve diferença significativa nas concentrações de TNF- α ou nos valores de TNF- α /Ureia entre os grupos de articulações ou entre os momentos de coleta do LS. Note que os p-valores são maiores que 5% (Tabelas 20 e 21).

Tabela 20 – Resumo estatístico do teste aplicado para comparação das concentrações de TNF- α no LS

	Wald	Graus de Liberdade	P-Valor
Temperatura	1.786	2	0.410
Momento	8.101	3	0.044
Temperatura:Momento	9.000	6	0.174

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Tabela 21 – Resumo estatístico do teste aplicado para comparação dos valores de TNF- α /Ureia no LS

	Estatística	Graus de Liberdade	P-Valor
Temperatura	1.990	2	0.370
Momento	9.505	3	0.023
Temperatura:Momento	8.872	6	0.181

Fonte: (BEZERRA, 2014)

7.2.7 Determinação dos GAGs no líquido sinovial

7.2.7.1 Condroitim Sulfato

Nos grupos de articulações irrigadas com soluções a 25 ou 38 °C houve aumento significativo das concentrações do CS no LS das amostras colhidas às 12 horas. Esse aumento tendeu a diminuir nas amostras colhidas 24 horas após a lavagem no grupo 38 °C, mantendo-se concentrações elevadas no grupo 25 °C. No grupo que recebeu o RL a 5 °C as concentrações do CS mantiveram-se iguais aos valores basais às 12 horas e só aumentaram às 24 horas, mantendo-se às 48 horas

. Comparando-se as concentrações entre os grupos percebe-se que às 12 horas a média das concentrações de CS das amostras do grupo 5 °C foi significativamente menor que as médias nos grupos 25 e 38 °C (Tabela 22 e Gráficos 11 e 12).

Tabela 22 – Dados estatísticos das concentrações de CS no LS de equinos submetidos a três diferentes temperaturas (5, 25 e 38 °C) de lavagem articular durante uma hora nos momentos 0, 12, 24 e 48 horas após o término do procedimento

Temperatura	Momento	n	Média	Desvio Padrão	Posto Médio	Efeito Relativo de Tratamento	Variância	L.I.	L.S.
5	0	4	23.74	14.44	11.00	0.22 ^a	0.04	0.13	0.35
5	12	4	15.24	9.42	6.25	0.12 ^{aA}	0.01	0.08	0.19
5	24	4	84.90	41.65	24.25	0.49 ^b	0.06	0.36	0.63
5	48	4	79.74	52.76	21.75	0.44 ^{bA}	0.13	0.26	0.64
25	0	4	49.39	23.14	18.50	0.38 ^a	0.03	0.28	0.49
25	12	4	131.82	19.60	33.25	0.68 ^{bB}	0.02	0.59	0.76
25	24	4	250.13	179.91	35.50	0.73 ^b	0.52	0.24	0.93
25	48	4	167.26	62.71	36.50	0.75 ^{bB}	0.05	0.59	0.85
38	0	4	30.10	5.59	14.75	0.30 ^a	0.06	0.18	0.46
38	12	4	132.25	47.84	31.75	0.65 ^{bB}	0.06	0.50	0.78
38	24	4	183.56	112.93	34.75	0.71 ^{ab}	0.42	0.28	0.92
38	48	4	101.80	88.79	25.75	0.53 ^{abAB}	0.36	0.23	0.80

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa dentro do grupo e letras maiúsculas entre os grupos. “n” número de amostras; L.I. limite inferior; L.S. limite superior.

Gráfico 11 – Demonstração gráfica em linha das médias das concentrações de CS no LS e os intervalos de confiança 95% nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Gráfico 12 – Demonstração gráfica em linha do efeito relativo de tratamento nas concentrações de CS no LS de equinos e os intervalos de confiança 95% nos quatro momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Depois de corrigidas as concentrações de CS no LS através da divisão pelos valores das concentrações de ureia percebe-se que os grupos 5 e 25 °C tendem a elevação de concentrações de CS com 12 horas, aumentando significativamente em relação aos valores iniciais, às 24 horas, o que se mantém às 48 horas, enquanto que o grupo de articulações irrigadas com fluido a 38 °C já apresentam um aumento significativo às 12 horas, com elevação significativa de 12 para 24 horas, tendendo à normalidade às 48 horas. Quando comparamos as coletas realizadas às 24 horas entre os grupos 5 e 38 °C percebemos que as concentrações de CS são estatisticamente maiores no grupo irrigado com RL a 38 °C (Tabela 23 e Gráficos 13 e 14).

Tabela 23 – Dados estatísticos dos valores de CS/Ureia no LS de equinos submetidos a três diferentes temperaturas (5, 25 e 38 °C) de lavagem articular durante uma hora nos momentos 0, 12, 24 e 48 horas após o término do procedimento

Temperatura	Momento	n	Média	Desvio Padrão	Posto Médio	Efeito Relativo de Tratamento	Variância	L.I.	L.S.
5	0	4	1.23	0.77	8.75	0.18 ^a	0.04	0.10	0.32
5	12	3	6.10	9.36	18.00	0.38 ^{ab}	0.45	0.13	0.75
5	24	4	3.61	1.93	23.25	0.49 ^{bA}	0.10	0.32	0.67
5	48	4	3.56	2.19	23.25	0.49 ^b	0.14	0.30	0.69
25	0	4	2.17	0.93	16.75	0.35 ^a	0.06	0.23	0.50
25	12	4	13.88	21.28	28.75	0.61 ^{ab}	0.19	0.36	0.81
25	24	4	7.72	5.39	31.50	0.67 ^{bAB}	0.47	0.26	0.90
25	48	4	6.71	2.81	34.50	0.74 ^b	0.04	0.61	0.83
38	0	4	1.50	0.32	11.75	0.24 ^a	0.07	0.13	0.43
38	12	4	3.37	1.30	23.75	0.51 ^b	0.07	0.36	0.65
38	24	3	9.13	0.91	40.00	0.86 ^{cB}	0.03	0.72	0.92
38	48	4	4.56	3.37	24.50	0.52 ^{abc}	0.35	0.23	0.80

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa dentro do grupo e letras maiúsculas entre os grupos. “n” número de amostras; L.I. limite inferior; L.S. limite superior.

Gráfico 13 – Demonstração gráfica em linha de CS/Ureia e os intervalos de confiança 95% no líquido sinovial de equinos nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Gráfico 14 - Demonstração gráfica em linha do efeito relativo de tratamento para os valores de CS/Ureia e os intervalos de confiança 95% nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

7.2.7.2 Ácido hialurônico

As concentrações de AH no LS diminuíram significativamente às 12 horas em todos os grupos. Porém, no grupo de articulações irrigadas com RL a 5 °C essa diminuição foi maior estatisticamente, aumentando significativamente os valores às 24 horas em comparação às 12 horas, com retorno aos valores basais às 48 horas. Já nos grupos 25 e 38 °C os valores tendem à normalidade às 24 horas, com normalização às 48 horas no grupo 25 °C (Tabela 24 e Gráficos 15 e 16).

Tabela 24 – Dados estatísticos das concentrações de AH no LS de equinos submetidos a três diferentes temperaturas (5, 25 e 38 °C) de lavagem articular durante uma hora nos momentos 0, 12, 24 e 48 horas após o término do procedimento

Temperatura	Momento	n	Média	Desvio Padrão	Posto Médio	Efeito Relativo de Tratamento	Variância	L.I.	L.S.
5	0	4	374.07	257.24	30.75	0.63 ^a	0.36	0.28	0.87
5	12	4	37.29	24.54	6.00	0.11 ^{bA}	0.01	0.07	0.20
5	24	4	214.43	143.32	17.25	0.35 ^c	0.07	0.22	0.51
5	48	4	386.47	256.79	32.00	0.66 ^a	0.34	0.30	0.88
25	0	4	379.09	81.24	31.75	0.65 ^a	0.11	0.45	0.80
25	12	4	171.52	79.35	15.50	0.31 ^{bB}	0.06	0.20	0.46
25	24	4	306.53	194.83	26.50	0.54 ^{ab}	0.34	0.24	0.81
25	48	4	432.55	139.39	35.50	0.73 ^a	0.13	0.48	0.88
38	0	4	354.75	38.06	29.75	0.61 ^a	0.05	0.47	0.73
38	12	4	176.43	74.41	16.75	0.34 ^{bB}	0.07	0.21	0.50
38	24	4	285.85	184.47	24.00	0.49 ^{ab}	0.24	0.24	0.74
38	48	4	357.08	335.52	28.25	0.58 ^{ab}	0.54	0.21	0.87

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa dentro do grupo e letras maiúsculas entre os grupos. “n” número de amostras; L.I. limite inferior; L.S. limite superior.

Gráfico 15 – Demonstração gráfica em linha das concentrações de AH no LS e os intervalos de confiança 95% no líquido sinovial de equinos nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Gráfico 16 – Demonstração gráfica em linha do efeito relativo de tratamento nas concentrações de AH e os intervalos de confiança 95% no líquido sinovial de equinos nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Depois de corrigidas pela ureia, as concentrações de AH do LS não sofreram alterações no grupo 25 °C. No grupo irrigado a 5 °C houve uma tendência a diminuição com 12 horas, que se mostrou significativa às 24 horas, retornando à normalidade às 48 horas. Já no grupo 38 °C essa diminuição já ocorreu às 12 horas, com retorno aos valores basais às 24 horas (Tabela 25 e Gráficos 17 e 18).

Tabela 25 – Dados estatísticos das concentrações dos valores de AH/Ureia no LS de equinos submetidos a três diferentes temperaturas (5, 25 e 38 °C) de lavagem articular durante uma hora nos momentos 0, 12, 24 e 48 horas após o término do procedimento

Temperatura	Momento	n	Média	Desvio Padrão	Posto Médio	Efeito Relativo de Tratamento	Variância	L.I.	L.S.
5	0	4	19.46	13.73	31.00	0.66 ^a	0.36	0.30	0.88
5	12	3	45.68	76.98	18.00	0.38 ^{ab}	0.48	0.12	0.76
5	24	4	8.73	5.70	14.75	0.31 ^b	0.05	0.20	0.45
5	48	4	17.38	11.38	29.25	0.63 ^a	0.30	0.31	0.85
25	0	4	16.93	4.07	29.25	0.63 ^a	0.12	0.42	0.79
25	12	4	17.86	27.25	19.25	0.41 ^a	0.40	0.15	0.75
25	24	4	9.49	5.85	17.25	0.36 ^a	0.15	0.19	0.60
25	48	4	17.32	6.27	29.75	0.64 ^a	0.09	0.45	0.78
38	0	4	17.76	3.68	31.25	0.67 ^a	0.08	0.49	0.80
38	12	4	4.50	2.00	11.25	0.23 ^b	0.09	0.12	0.45
38	24	3	13.53	2.44	24.67	0.53 ^a	0.04	0.41	0.63
38	48	4	15.63	12.96	25.25	0.54 ^{ab}	0.44	0.21	0.83

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa dentro do grupo e letras maiúsculas entre os grupos. “n” número de amostras; L.I. limite inferior; L.S. limite superior.

Gráfico 17 – Demonstração gráfica em linha de AH/Ureia e os intervalos de confiança 95% no líquido sinovial de equinos nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Gráfico 18 – Demonstração gráfica em linha do efeito relativo de tratamento para os valores de AH/Ureia e os intervalos de confiança 95% no líquido sinovial de equinos nos diferentes momentos de coleta

Fonte: (BEZERRA, 2014)

7.2.8 Correlações

As correlações entre os valores corrigidos dos biomarcadores foram testadas nos diferentes momentos de coleta, não sendo observada correlação alta entre quaisquer concentrações de marcadores no momento 0 hora. A maior correlação observada nesse momento foi entre as concentrações de PGE₂ e TNF-alfa (coeficiente de correlação de Spearman = 0.34).

No momento 12 horas nota-se uma alta correlação positiva entre CS e HA (coeficiente de correlação = 0.83) e entre PGE₂ e IL-1 β (coeficiente de correlação = 0.80). Portanto, quanto maior a concentração de CS espera-se uma maior concentração de AH nesse momento de avaliação. Esse comportamento também vale para PGE₂ e IL-1 β . No entanto, observa-se uma correlação negativa entre IL-1 β e TNF- α e entre AH e TNF- α (coeficientes de correlação de -0.54 e -0.51, respectivamente), ou seja, espera-se que para altas concentrações de IL-1 β , encontre-se baixas concentrações de TNF- α e vice-versa (Gráfico 19).

Gráfico 19 – Demonstração gráfica das correlações entre as variáveis PGE₂, TNF- α , IL-1 β , CS e AH, no momento 12 horas

Fonte: (BEZERRA, 2014)

No momento 24h observa-se uma correlação alta e positiva entre as concentrações de CS e HA com coeficiente de correlação 0.76 (Gráfico 20).

Gráfico 20 – Demonstração gráfica das correlações entre as variáveis PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, CS e AH, no momento 24 horas

Fonte: (BEZERRA, 2014)

No momento 48h observa-se uma alta correlação positiva entre a concentração de CS e HA (coeficiente de correlação = 0.80). Já entre as concentrações de CS e ILBeta , HA e ILBeta , observa-se uma correlação negativa (coeficientes de correlação de Spearman de -0.49 e -0.41, respectivamente) (Gráfico 21).

Gráfico 21 – Demonstração gráfica das correlações entre as variáveis PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, CS e AH, no momento 48 horas

Fonte: (BEZERRA, 2014)

A análise de correlação demonstra a interação entre duas variáveis em um determinado momento de avaliação e não a variação que acontece de um momento de coleta para outro. Tomando como exemplo as variações nas concentrações de CS e AH de 0 para 12 horas, nota-se que os valores aumentaram para a variável CS e diminuíram para a variável AH e essa mudança contrária nas concentrações não indica correlação entre as variáveis, mas sim padrões de variação diferentes. Observe no exemplo simplificado abaixo que mesmo com esse tipo de comportamento a correlação entre o CS e AH entre dois animais envolvidos no presente estudo é positiva (Gráficos 22 e 23).

Gráfico 22 – Gráfico demonstrando as variações das concentrações de CS e AH no LS de 0 para 12 horas, em duas articulações de animais diferentes, irrigadas com RL a 38 °C

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: CS – condroitim sulfato; AH – ácido hialurônico; A – articulação.

Gráfico 23 – Gráfico de dispersão das concentrações de CS e AH para as duas articulações demonstradas no gráfico 22

Fonte: (BEZERRA, 2014)

Nota: CS – condroitim sulfato; AH – ácido hialurônico; A – articulação.

Nota-se que a articulação que apresentou maior concentração de CS assim também o fez para o AH, exemplificando a correlação positiva.

8 DISCUSSÃO

As alterações de cartilagem causadas pela lavagem articular com fluidos comumente utilizados em artroscopia são sutis e acontecem na camada mais superficial, primariamente chamada de *lamina splendens* (ASPDEN; HUKINS, 1979), que é composta por proteoglicanos e glicoproteínas sobrepostas a fibras de colágeno tipo I, II e III e hoje referenciada como “camada mais superficial” da cartilagem articular (FUJIOKA; AOYAMA; TAKAKUMA, 2013; NISHIDA; INOUE; MURAKAMI, 1995).

Neste trabalho pudemos observar que a irrigação articular com RL durante uma hora proporcionou alterações na ultraestrutura da superfície articular de ovinos e equinos. Isso se deu provavelmente pelo carreamento de PGs presentes nessa camada mais superficial da cartilagem articular. Resultados similares já tinham sido observados por Bert et al. (1990) avaliando biopsias de cartilagem de humanos por MEV em pacientes submetidos à artroscopia. Nesse estudo a água destilada foi o fluido de infusão que mais causou alterações à cartilagem e a glicina 1,5% o que menos alterou. Porém, os pacientes não eram homogêneos e foram submetidos à artroscopia para tratamento de doença articular e provavelmente lesões prévias existiam, atrapalhando a comparação entre os grupos.

Outros estudos comparativos de soluções de infusão comumente utilizadas em artroscopia são contraditórios quanto à capacidade de alteração da ultraestrutura da superfície articular pelo RL. Yang, Cheng e Shen (1993) reportaram a indiferença entre o uso de solução salina, RL, água destilada ou sorbitol 3% em ratos, uma vez que as alterações avaliadas por MEV eram similares, concluindo que as soluções não proporcionavam efeitos deletérios à superfície da cartilagem articular. Porém Gradinger, Träger e Klauser et al. (1995), estudando cartilagem de bovinos *in vitro* concluíram que a solução de RL, além de proporcionar intensa liberação de PGs, provocou o aparecimento de buracos, cristas, aumento da rugosidade e apresentação de fibras quando avaliadas por MEV. Resultados semelhantes aos encontrados em nossa pesquisa, uma vez que diferentes graus de delaminação da camada mais superficial da cartilagem foram observados e, em alguns casos, chegando a expor a intensa rede de fibras de colágeno presente nas regiões mais profundas dessa camada.

As temperaturas de condicionamento do RL utilizadas nas duas etapas deste trabalho foram indiferentes quanto ao grau de alteração provocada na superfície articular. Esse achado contradiz resultado de estudo que avaliou por MEV as alterações na cartilagem articular causadas por diferentes temperaturas da solução de infusão *in vivo* (CHENG et al., 2004). Esses pesquisadores avaliaram as alterações de ultraestrutura da superfície da cartilagem articular de ratos submetidos à irrigação das articulações femoropatellares com solução salina a 3 diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C) e o grupo de animais irrigados com solução a 4 °C apresentou maior irregularidade de superfície e exposição de filamentos que os demais grupos quando observados por MEV. Os resultados da presente pesquisa mostram que o fator mecânico de passagem do líquido pela superfície articular durante uma hora de cirurgia provavelmente foi o causador das alterações encontradas, visto que as alterações foram semelhantes em todos os grupos.

A variação na temperatura corpórea dos animais utilizados nas duas etapas do experimento aconteceu independentemente da temperatura a que o fluido de infusão foi condicionado, de forma que as médias das temperaturas retais durante uma hora de cirurgia não foram diferentes significativamente. Esse resultado vai de encontro a alguns estudos com artroscopia de ombro em humanos (BOARD; SRINIVASAN, 2008; KIM et al., 2009), que comprovaram que o uso de solução de infusão à temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) foi capaz de provocar hipotermia nos pacientes, enquanto que o uso de solução aquecida (37 a 39 °C) não. No entanto, outro estudo em humanos (SÁNCHEZ-INCHAUSTI; VAQUERO-MARTÍN; VIDAL-FERNÁNDEZ, 2005) mostrou que, em artroscopias de joelho, a solução salina à temperatura ambiente (22 °C) reduziu a temperatura intra-articular de forma significativa, porém sem causar hipotermia nos pacientes. Tais pesquisas, apesar de padronizado o protocolo anestésico e o tempo cirúrgico das cirurgias serem aproximados pelos tipos de abordagens semelhantes, as idades dos pacientes variaram muito, conferindo à resposta individual um potencial de interferência nos resultados. Além disso, a distância do centro corpóreo (joelho) e a irrigação de uma cavidade próxima a grandes plexos vasculares (ombro) também prejudicam a comparação entre os trabalhos. Na primeira etapa da presente pesquisa utilizamos um modelo animal que apesar de ter menor peso corpóreo comparado aos humanos e a calha utilizada ainda ajudar na retenção do líquido no campo operatório próximo ao animal, as temperaturas utilizadas para irrigação

articular não influenciaram nas variações da temperatura corpórea. No caso dos equinos a distância da articulação do carpo para o centro corpóreo não é tão grande, entretanto o volume ósseo e muscular da caixa torácica tornam-se barreira para troca de calor.

A lavagem articular com RL em diferentes temperaturas não causou alteração estrutural ou migração celular nas membranas sinoviais dos ovinos e equinos utilizados neste experimento. No entanto, trabalhos mostraram que a membrana sinovial de cavalos naturalmente acometidos com OA pode ter alta expressão gênica para TNF- α , MMP-13, além de fatores anabólicos para produção de colágenos tipos I e II, ou ainda demonstrar direta ou indiretamente a presença de outros marcadores como IL-6 e PGE₂ por imunohistoquímica, quando comparados com animais acometidos pelas formas mais brandas da doença (KAMM; NIXON; WITTE, 2010; LEY et al., 2009; WESTMAN et al., 2004). Mais análises das amostras de membrana sinovial colhidas durante o presente experimento podem ser feitas para comparação entre as temperaturas.

Até o presente momento nenhum trabalho avaliou o comportamento da cartilagem, membrana sinovial ou LS de ovinos e equinos frente a diferentes temperaturas da solução de infusão durante procedimentos artroscópicos. As avaliações das concentrações de marcadores inflamatórios e de metabolismo articular nos diferentes grupos, para os diferentes momentos, serão comparadas, portanto, com outros trabalhos de análise sequencial, porém com insultos inflamatórios diferentes e sem a separação de grupos por temperaturas utilizadas durante artroscopias.

As concentrações de PGE₂ no LS das articulações dos equinos dos três grupos tiveram um aumento significativo às 12 horas, que se mantiveram acima dos valores iniciais até às 48 horas nos grupos 5 e 25 °C e tenderam a normalidade no grupo 38 °C. A PGE₂ é considerada um excelente marcador de reação inflamatória aguda (BERTONE; PALMER; JONES, 2001) e isso mostra que esse aumento aconteceu, provavelmente, pelos procedimentos de biopsia, que culminaram em resposta inflamatória na articulação e que o grupo de articulações lavadas com RL a 38 °C provavelmente foram menos afetadas.

Estudos utilizando modelo de indução de inflamação com infiltração articular de LPS (0,5 ng) em equinos, (GRAUW et al., 2009, 2011) encontraram aumento significativo das concentrações de PGE₂ no LS depois de 8 horas da infiltração.

Esse resultado é semelhante ao encontrado no presente trabalho, porém apenas pelo comportamento agudo de resposta inflamatória, uma vez que aqui a primeira coleta de LS só aconteceu às 12 horas. Outro resultado semelhante foi visto quando 0,25 ou 0,5 ng de LPS foram infiltrados na articulação intercárpica de equinos. As concentrações de PGE_2 aumentaram, atingindo um pico às 12 horas. Esse pico foi significativamente maior no grupo que recebeu a maior quantidade de LPS (LUCIA et al., 2013).

No presente estudo não foi possível determinar uma correlação entre a temperatura utilizada para irrigação articular e a concentração de PGE_2 encontrada no LS. No entanto, uma correlação importante entre a PGE_2 e a temperatura já foi comprovada em estudo comparando pacientes humanos submetidos a procedimentos artroscópicos simples, como ressecção parcial de menisco, quanto ao uso de dispositivo de crioterapia associada a compressão ou não. Neste trabalho os pacientes que receberam gelo no pós-operatório tiveram uma redução significativa da temperatura intra-articular e quanto menor foi a temperatura atingida, menor foi a produção de PGE_2 (STÅLMAN et al., 2011).

A falta de correlação entre a temperatura e a concentração de PGE_2 pode ser explicada pelo longo período entre o término da irrigação articular e a primeira coleta de LS, visto que a liberação dessa citocina pelos tecidos vivos tem relação comprovada com a temperatura a que o meio está exposto (MAJUMDAR; GOWDA; BROOKE, 1995). Assim, as amostras de membrana sinovial coletadas em T1 poderiam dar informação mais precisa quanto à temperatura utilizada na irrigação articular e a expressão gênica ou produção de PGE_2 . Análises mais específicas de membrana sinovial precisam ser realizadas para detecção de marcadores inflamatórios e sua relação com a temperatura utilizada durante as artroscopias.

As concentrações de IL-1 β no LS nos grupos 5 e 25 °C aumentaram significativamente às 12 horas e assim se mantiveram até às 24 horas em relação aos valores iniciais, tendendo à normalidade às 48 horas. O grupo de articulações lavadas com solução a 38 °C não apresentaram variações significativas nos diferentes momentos. Além disso, quando feitas comparações entre os grupos, nas coletas de 12 horas após o término da infusão, as concentrações de IL-1 β foram significativamente menores no grupo 38 °C em relação aos demais grupos, sendo também inferior ao grupo 5 °C às 24 horas.

Já as concentrações de TNF- α não variaram significativamente durante os momentos de coleta em nenhum dos grupos.

A IL-1 β e o TNF- α encontrados no LS são considerados bons marcadores de doença inflamatória em equinos e estão mais relacionados a doenças agudas severas (BERTONE; PALMER; JONES, 2001). Em humanos com osteoartrite essas citocinas são consideradas como guias da resposta inflamatória e a inativação do TNF- α pode ter efeito condroprotetor tão eficiente quanto o antagonista do receptor de IL-1 β (BONDESON et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2005). Saklatvala (1986) demonstrou que fragmentos de cartilagem suína incubados com IL-1 de suínos ou TNF- α recombinante de humanos, isoladamente, liberaram grande quantidade de proteoglicanos no meio de imersão e inibiram a produção de CS pelos condrócitos. Quando em combinação, a liberação de proteoglicanos duplicou. Curiosamente, o grupo de articulações lavadas com RL a 38 °C teve o maior pico de concentrações de CS, levando-nos a acreditar que a pouca produção de IL-1 β nesse grupo possa ter proporcionado uma maior produção de CS pelos condrócitos e detecção no meio articular, concordando com os achados de Saklatvala (1986). Porém, testes específicos para detecção de marcadores anabólicos e catabólicos de CS devem ser feitos para comprovação dessa suposição.

A estimulação causada pela IL-1 também foi comprovada em inúmeros outros trabalhos, mostrando a capacidade da citocina em aumentar a produção de vários outros marcadores pró-inflamatórios (BIRD et al., 1997; DAVID et al., 2007; MAY et al., 1992). As concentrações de IL-1 β detectadas no presente experimento variaram de 0 a 20,52 pg/mL. Bertone, Palmer e Jones (2001) concluíram que a IL-1 β pode ser usada como boa indicadora de doença articular e as concentrações maiores que 4,5 pg/mL já indicam doença inflamatória articular. Estudos em humanos mostram que as concentrações desse marcador podem ser mais elevadas mesmo em pacientes sem doença articular. Kubota et al. (1997) encontraram uma concentração média de IL-1 β de $285,1 \pm 260,1$ pg/mL em articulações temporomandibulares de paciente hígidos. Devido à extrema afinidade da IL-1 β pelos seus receptores de membrana, apenas uma pequena quantidade da citocina é necessária para o desencadeamento de uma resposta, sendo sua atividade máxima observada com menos de 5% dos receptores ocupados (AREND, 1991), o que destaca a importância das diferenças encontradas entre os grupos no presente trabalho.

Fato interessante do comportamento do TNF- α durante o experimento foi que seis articulações não apresentaram níveis detectáveis da citocina no LS em todos dos momentos. Dessas seis articulações, duas estavam em cada grupo. Outra curiosidade é que os animais que apresentaram detecção do TNF- α no momento 0 hora tiveram padrão muito semelhante na variação das concentrações durante os demais momentos. Assim percebe-se que os animais que já possuíam níveis da citocina no LS responderam de forma semelhante à lavagem articular, independentemente da temperatura utilizada.

Da mesma forma que o TNF- α foi incapaz de diferenciar os grupos de temperaturas utilizadas para irrigação articular, outras pesquisas comprovam a inabilidade do TNF- α em identificar ou distinguir tipos de lesões em equinos (BILLINGHURST; FRETZ; GORDON, 1995; JOUGLIN et al., 2000; LEY et al., 2007). O fato de alguns animais do experimento já possuírem níveis detectáveis de TNF- α no LS antes da lavagem articular pode ser explicado por outro mecanismo que não o de doença articular, como atividade atlética passada (BOOM et al., 2004).

Estudos também comprovaram a elevação precoce das concentrações do TNF- α no LS em equinos com artrite induzida por LPS, com pico das concentrações acontecendo 2 horas após a infiltração e reduzindo às 8 horas (HAWKINS et al., 1995).

Swärd et al. (2014), pesquisando a presença de marcadores inflamatórios em pacientes humanos com trauma grave no joelho, concluíram que o TNF- α estava significativamente mais concentrado no LS daqueles indivíduos que possuíam fratura osteocondral intra-articular do que naqueles sem fratura. Ainda, aqueles em que a fratura tinha descontinuidade e adentravam o osso esponjoso em direção à córtex óssea, tinham aumento ainda maior da citocina. Isso comprova que o TNF- α é um bom marcador quando se trata de injúria grave e que o modelo utilizado de lavagem articular com temperaturas diferentes, aliado a biopsias de membrana e osteocondral, não foi insulto suficiente para induzir aumento das concentrações dessa citocina no LS.

O CS presente no LS dos quinos utilizados nesse experimento teve um comportamento semelhante em todos os grupos. Houve um leve aumento não significativo às 12 horas e um pico às 24 horas. A única diferença ocorreu no grupo de articulações irrigadas com RL a 38 °C, nas quais a elevação foi significativa às 12 horas com relação ao momento inicial, com pico às 24 horas significativamente

maior que nos demais grupos. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos avaliando a indução de inflamação articular com LPS ou IL-1 recombinante de equino por Grau et al. (2009) e Ross et al. (2012). Os autores verificaram que 24 horas após a indução da inflamação acontecia um pico dos GAGs encontrados no LS que se manteve às 48 horas e diminuiu aos valores basais às 168 horas. Grau et al. (2009) ainda testaram a presença de marcador de síntese de Agrecan (epítipo CS846) e identificaram que as concentrações também tiveram um pico às 24 horas.

Kocaoglu et al. (2011), trabalhando com fragmentos de cartilagem de suínos incubados em solução salina condicionada a 4 diferentes temperaturas (4, 24, 32 e 37 °C), demonstraram que o metabolismo dos condrócitos e a liberação de GAGs no meio de imersão foram influenciados pela temperatura, sendo o grupo de amostras incubadas a 4 °C o mais afetado, apresentando significativa diminuição do metabolismo e maior liberação de GAGs.

Maiores concentrações de GAGs no LS podem ocorrer tanto por estímulo da síntese quanto por estímulo da degradação, cabendo aos biomarcadores específicos de cada processo auxiliar a determinação da causa certa (ROSS et al., 2012). A capacidade anti-inflamatória do CS tem sido comprovada através do mecanismo de inibição do fator nuclear *kappa* de células B ativadas (NF-*κ*B), diminuindo a produção de citocinas inflamatórias (VOLPI, 2011).

Acreditamos que o aumento de CS no LS dos equinos submetidos a lavagem articular se dê principalmente por liberação pela MEC do que por uma produção de novos peptídeos, porém testes mais específicos precisam ser feitos para comprovação desse fato.

As concentrações de AH no LS diminuíram significativamente às 12 horas no grupo 38 °C e às 24 horas no grupo 5 °C, não sendo observada nenhuma alteração no grupo de articulações irrigadas a 25 °C. Porém, a comparação entre os grupos não mostrou diferença significativa quando tomados os momentos isoladamente. Esse resultado está de acordo com alguns outros nos quais, apesar do AH não ser capaz de diferenciar o grau de lesão articular, estava significativamente diminuído em doenças infecciosas e degenerativas (FULLER et al., 2001; TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1994). Com modelo de indução química de sinovite em cavalos jovens, Welch et al. (1991) demonstraram que as concentrações de AH

aumentavam, porém também não conseguiram diferenciar os animais artrite induzidos dos controles.

Antonacci et al. (2012) concluíram que as concentrações de AH no LS de cavalos naturalmente acometidos com doença articular só diminuiu significativamente nos casos agudos (trauma articular ou pequenas fraturas intra-articulares). Demonstraram ainda que as moléculas de AH que mais diminuía as concentrações eram aquelas de alto peso molecular. Nos casos de OA as concentrações de AH não diminuía de forma significativa. Provavelmente, os procedimentos de biopsia osteocondral e a própria lavagem articular durante uma hora foram os responsáveis pela diminuição do AH no presente estudo.

David-Raoudi et al. (2009) demonstraram que cultura de sinoviócitos tipo B de humanos com osteoartrite, quando incubadas em meio contendo CS, aumentaram tanto a produção quanto o peso molecular do AH. Esse dado pode ser comparado ao encontrado na presente pesquisa pelo fato de ter sido encontrada correlação positiva alta em todos os períodos pós-lavagem articular para o CS e o AH presentes no LS dos equinos envolvidos no projeto (coeficientes de correlação = 0,83; 0,76 e 0,80; para os momentos 12, 24 e 48 horas, respectivamente), podendo o CS ter estimulado a maior presença de maior concentração de AH.

O tratamento pós-operatório dos equinos utilizados nesse experimento não envolveu a utilização de anti-inflamatórios. No SCGA/FMVZ-USP geralmente se usa fenilbutazona na dose de 4,4 mg/kg. Os trabalhos são controversos quanto à influência da fenilbutazona presente no LS na atividade metabólica articular, sendo alguns a favor da utilização por propriedades indutoras de síntese de proteoglicanos (FREAN; CAMBRIDGE; LEES, 2002) e outros contra, pela inibição das concentrações de marcador de síntese de colágeno (GRAUW et al., 2014). Grauw, Lest e Weeren (2009) demonstraram que o meloxicam utilizado por via oral em equinos com inflamação articular aguda induzida por LPS foi eficaz na diminuição das concentrações de PGE₂, substância P, GAGs e MMP no LS. Diante da incerteza de interferência nas concentrações de marcadores articulares frente ao uso de anti-inflamatórios não esteroidais, resolvemos não utilizá-los.

9 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que a irrigação articular com Ringer com lactato leva a alterações na ultraestrutura da superfície cartilágnea, observadas pelo aparecimento de cristas, delaminação e exposição de fibras colágenas, independentemente da temperatura utilizada, o que sugere que o fator mecânico seja preponderante. Por outro lado, a análise dos marcadores inflamatórios, apesar de haver diferença significativa entre os grupos apenas para IL1 β , sugerem, de forma geral que as alterações foram menos acentuadas nas articulações irrigadas com fluido a 38 °C. Já na avaliação de marcadores de metabolismo, não é possível determinar ou sugerir qual temperatura é menos deletéria, uma vez que para o AH não houve diferença entre os grupos e a elevação significativa de CS encontrada para o grupo 38 °C às 24 horas pode ter origem anabólica ou catabólica.

REFERÊNCIAS

- AIGNER, T.; SOEDER, S.; HAAG, J. IL-1beta and BMPs--interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. **European Cells & Materials**, v. 12, p. 49-56; discussion 56, 2006.
- AKGUN, U.; KOCAOGLU, B.; ERGUN, S.; KARAHAN, M.; TURKMEN, M. The effect of environmental pH change on bovine articular cartilage metabolism: implications for the use of buffered solution during arthroscopy? **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, 2013.
- ANTONACCI, J. M.; SCHMIDT, T. A.; SERVENTI, L. A.; *et al.* 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. 2917-26, 2012.
- ARCIERO, R. A.; LITTLE, J. S.; LIEBENBERG, S. P.; PARR, T. J. Irrigating solutions used in arthroscopy and their effect on articular cartilage. An in vivo study. **Orthopedics**, v. 9, n. 11, p. 1511-5, 1986.
- AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 5, p. 1445-1451, 1991.
- AROKOSKI, J. P.; JURVELIN, J. S.; VÄÄTÄINEN, U.; HELMINEN, H. J. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 10, n. 4, p. 186-98, 2000.
- ASPDEN, R. M.; HUKINS, D. W. L. The lamina splendens of articular cartilage is an artefact of phase contrast microscopy. **Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences**, v. 206, n. 1162, p. 109-113, 1979.
- BACCARIN, R. Y. A.; RASERA, L.; MACHADO, T. S. L.; 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.
- BERT, J. M. Use of 1.5% glycine as a nonconductive fluid medium for arthroscopic electrosurgery. **Arthroscopy**, v. 3, n. 4, p. 248-252, 1987.
- BERT, J. M.; POSALAKY, Z.; SNYDER, S.; MCGINLEY, D.; CHOCK, C. Effect of various irrigating fluids on the ultrastructure of articular cartilage. **Arthroscopy**, v. 6, n. 2, p. 104-11, 1990.
- 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.
- 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.

BIRD, J. L.; WELLS, T.; PLATT, D.; BAYLISS, M. T. IL-1 beta induces the degradation of equine articular cartilage by a mechanism that is not mediated by nitric oxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 238, n. 1, p. 81-5, 1997.

BOARD, T. N.; SRINIVASAN, M. S. The effect of irrigation fluid temperature on core body temperature in arthroscopic shoulder surgery. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 128, n. 5, p. 531-3, 2008.

BONDESON, J.; WAINWRIGHT, S. D.; LAUDER, S.; AMOS, N.; HUGHES, 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 & Therapy**, v. 8, n. 6, p. R187, 2006.

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

BOOM, R.; LEST, C. H. A.; 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, 2010.

BOYCE, M. K.; TRUMBLE, T. N.; CARLSON, C. S.; GROSCHE, D. M.; MERRITT, K. A.; BROWN, M. P. Non-terminal animal model of post-traumatic osteoarthritis induced by acute joint injury. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 21, n. 5, p. 746-55, 2013.

BRUNNER, E.; PURI, M. L. Nonparametric methods in factorial designs. **Statistical Papers**, v. 42, n. 1, p. 1-52, 2001.

CATTERALL, J. B.; STABLER, T. V.; FLANNERY, C. R.; KRAUS, V. B. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254). **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 6, p. R229, 2010.

CHENG, S.C.; JOU, I.M.; CHERN, T.C.; WANG, P.H.; CHEN, W.C. The effect of normal saline irrigation at different temperatures on the surface of articular cartilage: an experimental study in the rat. **Arthroscopy**, v. 20, n. 1, p. 55-61, 2004.

COLLINS, D. H.; MCELLIGOTT, T. F. Sulphate ($^{35}\text{SO}_4$) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteo-arthritic human articular cartilage. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 19, n. 4, p. 318-330, 1960.

DAVID, F.; FARLEY, J.; HUANG, H.; LAVOIE, J.-P.; LAVERTY, S. Cytokine and chemokine gene expression of IL-1beta stimulated equine articular chondrocytes. **Veterinary surgery**, v. 36, n. 3, p. 221-7, 2007.

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. 760-70, 2009.

ENGSTRÖM-LAURENT, A. Hyaluronan in joint disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 242, n. 1, p. 57–60, 1997.

FLUGGE, L. A.; MILLER-DEIST, L. A.; PETILLO, P. A. Towards a molecular understanding of arthritis. **Chemistry & Biology**, v. 6, n. 6, p. R157-66, 1999.

FREAN, S. P.; CAMBRIDGE, H.; LEES, P. Effects of anti-arthritic drugs on proteoglycan synthesis by equine cartilage. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 4, p. 289-298, 2002.

FRISBIE, D. D. Surgical Treatment of Joint Disease. In: AUER, J.; STICK, J. (Eds.). **Equine surgery**. 4th. ed. St. Louis, MO: Elsevier, 2012. p. 1123-1130.

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. 1196-204, 2008.

FUJIOKA, R.; AOYAMA, T.; TAKAKUWA, T. The layered structure of the articular surface. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 8, p. 1092-8, 2013.

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.

GOLDRING, M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 9, p. 1916-26, 2000.

GRADINGER, R.; TRÄGER, J.; KLAUSER, R. J. Influence of various irrigation fluids on articular cartilage. **Arthroscopy**, v. 11, n. 3, p. 263-269, 1995.

GRAUW, J. C. DE; LEST, C. H. A. VAN DE; WEEREN, P. R. VAN. Inflammatory mediators and cartilage biomarkers in synovial fluid after a single inflammatory insult: a longitudinal experimental study. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 2, p. R35, jan 2009.

GRAUW, J. C. de; LEST, C. H. A. van de; WEEREN, P. R. van. A targeted lipidomics approach to the study of eicosanoid release in synovial joints. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 4, p. R123, 2011.

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

GRAUW, J. C.; LEST, C. H. A.; BRAMA, P. A. J.; RAMBAGS, B. P. B.; WEEREN, P. R. In vivo effects of meloxicam on inflammatory mediators, MMP activity and cartilage biomarkers in equine joints with acute synovitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 7, p. 693-699, 2009.

GULIHAR, A.; BRYSON, D. J.; TAYLOR, G. J. S. Effect of different irrigation fluids on human articular cartilage: an in vitro study. **Arthroscopy**, v. 29, n. 2, p. 251-6, 2013.

HARDINGHAM, T. E.; EWINS, R. J.; MUIR, H. Cartilage proteoglycans. Structure and heterogeneity of the protein core and the effects of specific protein modifications on the binding to hyaluronate. **The Biochemical Journal**, v. 157, n. 1, p. 127-43, 1976.

HASSELL, J. R.; KIMURA, J. H.; HASCALL, V. C. Proteoglycan core protein families. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 539-67, 1986.

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

HEINEGÅRD, D.; HASCALL, V. C. Aggregation of cartilage proteoglycans. 3. Characteristics of the proteins isolated from trypsin digests of aggregates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 13, p. 4250-6, 1974.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. **Nonparametric statistical methods**. New York, NY: John Wiley & Sons, 1973. p. 503

JOUGLIN, M.; ROBERT, C.; VALETTE, J. P.; GAVARD, F.; QUINTIN-COLONNA, F.; DENOIX, J. M. Metalloproteinases and tumor necrosis factor- α activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. **Veterinary Research**, v. 31, n. 5, p. 507-15, 2000.

JURVELIN, J. S.; JURVELIN, J. A.; KIVIRANTA, I.; KLAUSER, R. J. Effects of different irrigation liquids and times on articular cartilage: An experimental, biomechanical study. **Arthroscopy**, v. 10, n. 6, p. 667-672, 1994.

JURVELIN, J. S.; MÜLLER, D. J.; WONG, M.; STUDER, D.; ENGEL, A.; HUNZIKER, E. B. Surface and subsurface morphology of bovine humeral articular cartilage as assessed by atomic force and transmission electron microscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 117, n. 1, p. 45-54, 1996.

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. 693-9, 2010.

KANDEL, R. A.; PETELYCKY, M.; DINARELLO, C. A.; MINDEN, M.; PRITZKER, K. P.; CRUZ, T. F. Comparison of the effect of interleukin 6 and interleukin 1 on collagenase and proteoglycan production by chondrocytes. **The Journal of Rheumatology**, v. 17, n. 7, p. 953-7, 1990.

KIM, Y.S.; LEE, J.Y.; YANG, S.C.; SONG, J. H.; KOH, H. S.; PARK, W. K. Comparative study of the influence of room-temperature and warmed fluid irrigation on body temperature in arthroscopic shoulder surgery. **Arthroscopy**, v. 25, n. 1, p. 24-9, 2009.

KOBAYASHI, M.; SQUIRES, G. R.; MOUSA, A.; TANZER, M.; ZUKOR, D. J.; ANTONIOU, J.; FEIGE, U.; POOLE, A. R. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 1, p. 128-35, 2005.

KOCAOGLU, B.; MARTIN, J.; WOLF, B.; KARAHAN, M.; AMENDOLA, A. The effect of irrigation solution at different temperatures on articular cartilage metabolism. **Arthroscopy**, v. 27, n. 4, p. 526-31, 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. 420-7, 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. 1217-20, 2007.

KUBOTA, E.; IMAMURA, H.; KUBOTA, T.; SHIBATA, T.; MURAKAMI, K.-I. Interleukin 1 β and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 1, p. 20-27, 1997.

LANE, J. M.; CHISENA, E.; BLACK, J. Experimental knee instability: early mechanical property changes in articular cartilage in a rabbit model. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 140, p. 262-5, 1979.

LEE, R. C.; FRANK, E. H.; GRODZINSKY, A. J.; ROYLANCE, D. K. Oscillatory compressional behavior of articular cartilage and its associated electromechanical properties. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 103, n. 4, p. 280-92, 1981.

LEY, C.; EKMAN, S.; ELMÉN, A.; NILSSON, G.; ELORANTA, M.L. Interleukin-6 and tumour necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology. **Journal of veterinary medicine**, v. 54, n. 7, p. 346-51, 2007.

LEY, C.; EKMAN, S.; RONÉUS, B.; ELORANTA, M.L. Interleukin-6 and high mobility group box protein-1 in synovial membranes and osteochondral fragments in equine osteoarthritis. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 3, p. 490-7, 2009.

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

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**, 2012.

MAJUMDAR, R.; GOWDA, D.; BROOKE, M. H. Evidence of a temperature-sensitive step in the release of prostaglandin E2 in calcium ionophore-stimulated rat muscle. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 53, n. 2, p. 117-122, ago 1995.

MAROUDAS, A. Physicochemical properties of cartilage in the light of ion exchange theory. **Biophysical Journal**, v. 8, n. 5, p. 575-95, 1968.

MARTEL-PELLETIER, J.; BOILEAU, C.; PELLETIER, J. P.; ROUGHLEY, P. J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. **Best Practice & Research. Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 351-84, 2008.

MAY, S. A.; HOOKE, R. E.; LEES, P. Interleukin-1 stimulation of equine articular cells. **Research in Veterinary Science**, v. 52, n. 3, p. 342-348, 1992.

MCILWRAITH, C. W. Current concepts in equine degenerative joint disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 3, p. 239-50, 1982.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; FULLER, C. J.; HURTIG, M.; CRUZ, A. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18 Suppl 3, p. S93-105, 2010.

MYERS, E. R.; ZHU, W.; MOW, V. C. Viscoelastic properties of articular cartilage and meniscus. In: NIMNI, M. E. (Ed.). **Collagen Biochemistry & Biomechanics** [S.l.]: CRC Press, 1988. p. 267-288.

NARMONEVA, D. A.; WANG, J. Y.; SETTON, L. A. A noncontacting method for material property determination for articular cartilage from osmotic loading. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 6, p. 3066-76, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carbohydrates and Glycobiology. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Eds.). **Lehninger principles of biochemistry**. 5th. ed. New York, NY: W.H. FREEMAN AND COMPANY, 2008. p. 235-270.

NESBITT, R. J.; HERFAT, S. T.; BOGUSZEWSKI, D. V; ENGEL, A. J.; GALLOWAY, M. T.; SHEARN, J. T. Primary and secondary restraints of human and ovine knees for simulated in vivo gait kinematics. **Journal of Biomechanics**, v. 47, n. 9, p. 2022-7, 2014.

NISHIDA, K.; INOUE, H.; MURAKAMI, T. Immunohistochemical demonstration of fibronectin in the most superficial layer of normal rabbit articular cartilage. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 54, n. 12, p. 995-8, 1995.

R Core Team: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. 2013. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>. Acesso em 05 de ago 2014.

REAGAN, B. F.; MCINERNY, V. K.; TREADWELL, B. V.; ZARINS, B.; MANKIN, H. J. Irrigating solutions for arthroscopy. A metabolic study. **Journal of Bone and Joint Surgery - Series A**, v. 65, n. 5, p. 629-631, 1983.

REAGAN, B.; ZARINS, B.; MANKIN, H. J. Low conductivity irrigating solutions for arthroscopy. **Arthroscopy**, v. 7, n. 1, p. 105-107, 1991.

ROSS, T. N.; KISIDAY, J. D.; HESS, T.; MCILWRAITH, C. W. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 20, n. 12, p. 1583-90, 2012.

SAJDERA, S. W.; HASCALL, V. C. Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage. A comparison of low and high shear extraction procedures. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 1, p. 77-87, 1969.

SAKLATVALA, J. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. **Nature**, v. 322, n. 6079, p. 547-9, 1986.

SÁNCHEZ-INCHAUSTI, G.; VAQUERO-MARTÍN, J.; VIDAL-FERNÁNDEZ, C. Effect of arthroscopy and continuous cryotherapy on the intra-articular temperature of the knee. **Arthroscopy**, v. 21, n. 5, p. 552-6, 2005.

SOKOLOFF, L. Elasticity of articular cartilage: effect of ions and viscous solutions. **Science**, v. 141, n. 3585, p. 1055-1057, 1963.

STÅLMAN, A.; BERGLUND, L.; DUNGNERC, E.; ARNER, P.; FELLÄNDER-TSAI, L. Temperature-sensitive release of prostaglandin E₂ and diminished energy requirements in synovial tissue with postoperative cryotherapy: a prospective randomized study after knee arthroscopy. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 93, n. 21, p. 1961-8, 2011.

SWÄRD, P.; STRUGLICS, A.; ENGLUND, M.; ROOS, H. P.; FROBELL, R. B. Soft tissue knee injury with concomitant osteochondral fracture is associated with higher degree of acute joint inflammation. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 5, p. 1096-102, 2014.

SWINDLE, M. M.; ADAMS, R. J. **Experimental surgery and physiology**: induced animal models of human diseases. Baltimore, MD 21202: Williams & Wilkins, 1988. 350 p.

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.

TYYNIN, A.; KARLSSON, J. Biological treatment of joint cartilage damage. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 10, n. 5, p. 249-65, 2000.

VANWANSEEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STÜSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 10, n. 5, p. 408-19, 2002.

VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R.; YOSHINARI, N. H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 3, p. 160-166, 2003.

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

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

WESTMAN, M.; KOROTKOVA, M.; AF KLINT, E.; STARK, A.; AUDOLY, L. P.; KLARESKOG, L.; ULFGREN, A. K.; JAKOBSSON, P. J. Expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 in rheumatoid arthritis synovium. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 6, p. 1774-80, 2004.

YANG, C.; CHENG, S.; SHEN, C. Effect of irrigation fluids on the articular cartilage: A scanning electron microscope study. **Arthroscopy**, v. 9, n. 4, p. 425-430, 1993.