CRISTINA DE FARIA MANTOVANI

Análise metabolômica (^{1}H RMN) do líquido sinovial de equinos hígidos e acometidos por osteocondrite dissecante

São Paulo

2013

CRISTINA DE FARIA MANTOVANI

Análise metabolômica (^{1}H RMN) do líquido sinovial de equinos hígidos e acometidos por osteocondrite dissecante

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. Luis Claudio Lopes Correia da Silva

São Paulo – SP

2013

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.2899
FMVZ

Mantovani, Cristina de Faria
Análise metabolômica (^{1}H RMN) do líquido sinovial de equinos hígidos e acometidos por osteocondrite dissecante. / Cristina de Faria Mantovani. -- 2013.
113 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

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

1. Perfil metabólico. 2. Metabolismo articular. 3. Metabólitos. 4. Espectroscopia. 5. Ressonância magnética nuclear de prótons. 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 "Análise metabolômica (1H NMR) do líquido sinovial de equinos hígidos e acometidos por Osteocondrite Dissecante", protocolado sob o nº 3155/2013, utilizando 25 (vinte e cinco) equinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Luis Claudio Lopes Correia da Silva, foi aprovado em reunião de 16/10/2013 e 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.

We certify that the Research "1H NMR-base metabolomics for the investigation of normal and osteochondritic synovial fluid in the horse", protocol number 3155/2013, utilizing 25 (twenty five) horses, under the responsibility Prof. Dr. Luis Claudio Lopes Correia da Silva, was approved in the meeting of day 16/10/2013 and 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.

São Paulo, 17 de outubro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MANTOVANI, Cristina de Faria

Título: Análise metabolômica (^{1}H RMN) do líquido sinovial de equinos hígidos e acometidos por osteocondrite dissecante

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 ao meu amado pai, Mario Mantovani (in memoriam). Meu grande exemplo de amor, doçura, retidão de caráter e doação profissional. Quem despertou em mim o gosto pela cirurgia e pela pesquisa. Seu legado e sua presença permanecem fortes em tudo que vivemos. Sua lembrança e seu amor, eternamente em nossos corações. É o que nos faz seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as possibilidades a mim apresentadas e por permitir que eu fizesse o máximo delas.

À minha mãe, Heloisa de Faria Mantovani, meu exemplo de amor, força e superação. Seu apoio em todos os setores da minha vida foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Obrigada por estar forte e presente em todas as dificuldades e vibrante em todas as conquistas.

Ao meu marido Luigi Jovane, a quem amo e admiro profundamente. Agradeço pelo companheirismo e por me inspirar com seu exemplo profissional. Obrigada por me fazer uma pessoa melhor e por estar ao meu lado nas maiores provações da minha vida.

Aos meus irmãos Mario Eduardo e Flavia de Faria Mantovani, por estarem sempre ao meu lado, pelo companheirismo e por apoiar sempre as minhas decisões e me incentivar a lutar.

Ao meu querido orientador, Professor Luis Claudio Lopes Correia da Silva, pelo aceite na pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos, por todas as oportunidades e pela amizade.

Ao Professor Durvanei Augusto Maria por abrir as portas do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan e possibilitar que eu entrasse em contato com o mundo celular. Seu exemplo de entusiasmo e envolvimento com a pesquisa me ensinaram muito.

Ao Professor Alviclér Magalhães por ter me acolhido no Instituto de Química da UNICAMP como integrante de seu grupo de pesquisa e por ter apresentado ao estimulante universo da metabolômica. Muito mais do que pela recepção, serei eternamente grata por todo o apoio e por sua disponibilidade na realização desta pesquisa.

À Professora Raquel, por estar sempre presente e pela grandiosa ajuda em todas as etapas de todos os projetos que fizeram parte do meu mestrado. Obrigada por fazer as coisas acontecerem.

À Dra. Yara Michelacci por sua ajuda e disponibilidade e por esclarecer os tão complexos mecanismos da bioquímica

Ao Professor Wilson por todos os momentos de convivência, pela amizade e por todo o carinho e preocupação comigo.

À Professora Cristina Massoco por todo o apoio durante o período de cultivo celular e por estar sempre disponível para discutir assuntos referentes ao projeto, sempre com colocações muito proveitosas.

Aos Profs. Silvia Cortopassi, Aline Ambrósio, Denise Fantoni e André Zoppa pela maravilhosa convivência em São Paulo e Pirassununga.

Aos irmãos tão queridos que ganhei na Pós-graduação, Fernanda de Castro Stievani, Marilene Machado Silva e Kaio Barros Bezerra que, sem dúvidas, contribuíram para tornar esta etapa um período tão prazeroso. Obrigada pela amizade que construímos, pelo companheirismo em tudo, pelas constantes risadas e por toda a ajuda na execução da pesquisa e na confecção desta dissertação. TBs!

À Thaís Sodré pela amizade, pelos conselhos valiosos, pelo ombro amigo nas horas difíceis e por fornecer parte de seu material para realização deste projeto.

Às amigas Juliana Junqueira Moreira, Ana Paula Moraes, Aline Ambrogi e Joice Fulber pela amizade e por compartilharem comigo todas as alegrias e desesperos que a pesquisa pode proporcionar.

Aos amigos Fernanda Maschietto, Maria Leticia Piffer, Paulo Bogossian, Júlio Spagnolo e Mônica Lente pela amizade e por todos os momentos de boa convivência, dentro e fora da Universidade.

Aos funcionários Marcos Roberto Alves, Henrique Fragoso e Cícero Antônio da Silva, pelos momentos de descontração e pela indispensável ajuda.

À Maria Augusta Alonso e Patrícia Brossi por tão gentilmente cederem os animais de seu haras para as coletas de líquido sinovial.

Aos animais de pesquisa, por serem parte fundamental deste projeto e por fornecerem uma colaboração imensurável, mesmo que não voluntária, para a sua espécie.

A todos os docentes e colegas da Pós-graduação que me acompanharam neste período de evolução pessoal e que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

À Universidade de São Paulo, por ter me acolhido e possibilitado a realização desta pesquisa. Sinto-me em casa.

RESUMO

MANTOVANI, C. F. **Análise metabolômica (^{1}H RMN) do líquido sinovial de equinos hígidos e acometidos por osteocondrite dissecante.** [^{1}H NMR-base metabolomics for the investigation of normal and osteochondritic synovial fluid in the horse] 2013. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A osteocondrite dissecante (OCD) é uma das principais doenças que afetam os equinos jovens e uma das condições incluídas nas Doenças Ortopédicas do Desenvolvimento. Por se tratar de importante afecção articular, a OCD pode ser responsabilizada por perdas econômicas substanciais em decorrência da diminuição do desempenho atlético e reprodutivo dos animais acometidos. Sua etiologia é considerada multifatorial sendo associada a fatores nutricionais, endócrinos, genéticos e biomecânicos. A análise dos biomarcadores do líquido sinovial fornece dados fundamentais acerca das alterações representativas de inflamação e danos à cartilagem articular, por isso o monitoramento do ambiente articular caracteriza-se como uma importante ferramenta para o diagnóstico e acompanhamento da progressão da doença. A análise metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de prótons de hidrogênio (^{1}H RMN) é um método de avaliação holístico, simultâneo e em tempo real, dos metabólitos de pequenas moléculas presente no líquido sinovial, capaz de fornecer dados a respeito da progressão da doença, da resposta a tratamentos e de determinar biomarcadores. No presente estudo objetivou-se estabelecer o perfil metabólico global do líquido sinovial de equinos acometidos por OCD, estudar a aplicabilidade da ^{1}H RMN no diagnóstico da OCD e avaliar a possibilidade de distinção entre os líquidos sinoviais de articulações com OCD sintomática e assintomática. A determinação do perfil metabólico do líquido sinovial de equinos hígidos e acometidos por OCD assintomática e sintomática resultou em 32 metabólitos comuns às três condições articulares. Além destes, 2 compostos foram identificados somente nas articulações doentes, sendo eles o propilenoglicol e o composto aromático, porém, não foi possível diferenciar as articulações com OCD assintomática das articulações sintomáticas, pois ambos os grupos apresentavam metabólitos semelhantes e com intensidades similares.. Na comparação entre a intensidade dos espectros, observaram-se aumentos dos metabólitos glicose, glutamina, etanol, leucina, isoleucina, dimetilsulfona, creatina, creatinina, N-acetilglucosamina e N-acetilglutamina e τ-metil histidina e dos compostos propilenoglicol e

composto aromático nas articulações com OCD com relação às hígidas. Dos metabólitos que apresentaram redução na intensidade dos espectros das articulações doentes têm-se o 3-hidroxibutirato e o acetato. Outros metabólitos demonstraram a mesma intensidade de sinal para os três tipos de articulação, sendo eles: piruvato, citrato, metionina, histidina, tirosina, valina, lactato, alanina, glicina, glicerol e fenilalanina. A análise estatística por PCA foi capaz de realizar o agrupamento dos espectros e atribuir a importância do composto aromático na diferenciação entre os animais hígidos e doentes. A análise metabolômica por 1H NMR mostrou-se técnica com alta reprodutibilidade entre as amostras e sensibilidade de detecção dos componentes do líquido sinovial, revelando claras diferenças entre os perfis bioquímicos de articulações hígidas e acometidas por OCD, indicativo das alterações metabólicas que ocorrem com a progressão desta doença, relacionadas principalmente com o processo de degradação cartilagínea. Este estudo salienta o potencial da análise metabolômica em fornecer uma nova perspectiva dos processos bioquímicos envolvidos na progressão da OCD.

Palavras-chave: Perfil metabólico. Metabolismo articular. Metabólitos. Espectroscopia. Ressonância magnética nuclear de prótons.

ABSTRACT

MANTOVANI, C. F. **^{1}H NMR-base metabolomics for the investigation of normal and osteochondritic synovial fluid in the horse.** [Análise metabolômica (^{1}H RMN) do líquido sinovial de equinos hígidos e acometidos por osteocondrite dissecante] 2013. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Osteochondritis dissecans (OCD) is one of the most common diseases affecting young horses and one of the conditions classified as Developmental Orthopedic Diseases. As an important joint disorder, OCD is held responsible for substantial economic losses in consequence of the decrease in athletic and reproductive performance in affected horses. The condition presents a multifactorial ethiology, related to nutritional, endocrine, genetic and biomechanical factors, although its pathogeny is well established, associated with a disturbance of the process of endochondral ossification. Synovial fluid biomarkers analysis provide data regarding changes representative of inflammation and articular cartilage damage, which is why monitoring the joint cavity is an important tool for diagnosis and assessing disease progression. Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy is a holistic, simultaneous and real time approach, of the metabolites present in the synovial fluid, offering the potential to provide data regarding disease progression, response to treatment and to determine disease biomarkers. The aim of the present study was to establish the global metabolic profiling of normal and osteochondritic synovial fluid, to evaluate the applicability of the ^{1}H RMN in the diagnosis of OCD, and to asses possible distinctions between symptomatic and asymptomatic horses. The metabolic profile determination resulted in 32 common metabolites to the three joint conditions. Moreover, 2 compounds were identified exclusively in the diseased joints, namely propylene glycol and aromatic compound, but we were unable to discern between asymptomatic and symptomatic individuals for both groups presented similarities in metabolites as well as their concentrations. When comparing spectral intensities, we observed marked increases in the metabolites glucose, glutamine, ethanol, leucine, isoleucine, dimethyl sulphone, creatine, creatinine, N-acetylglucosamine, N-acetylglutamine and τ-methyhistidine, besides the compounds propylene glycol and aromatic compound, in the affected joints compared to the healthy ones. Decrease in spectral intensities were related to the metabolites 3-hydroxybutirate and acetate in affected joints. Other metabolites showed no difference in

intensities in all joint conditions, those being pyruvato, citrate, methionine, histidine, tyrosine, valine, lactate, alanine, glycine, glycerol and phenylalanine. PCA based statistical analysis was able to group spectra and to ascribe the importance of the aromatic compound in differentiating healthy from diseased joints. ^{1}H RMN spectroscopy showed high reproductability between samples and sensitive in detecting synovial fluid compounds, unveiling clear diferences between the biochemical profiles of healthy and OCD affected joints, thus indicating metabolic alterations occuring with disease progression, related mainly with the cartilage degradation process. This study projects the potential of metabolomics analysis in providing a new perspective of the biochemical processes involved in OCD progression.

Key words: Metabolic profile. Joint metabolism. Metabolites. Spectroscopy. Proton nuclear magnetic resonance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática (A) do complexo articular-epifisárioda cartilagem com as respectivas zonas dos condrócitos e corte histológico (B) da mesma região **25**

Figura 2 - Representação esquemática dos componentes da matriz extracelular da cartilagem **28**

Figura 3 - Esquema representativo do processo de ossificação endocondral.... **31**

Figura 4 - Diagrama representando a patogenia da osteocondrite dissecante.... **34**

Figura 5 - Diagrama demonstrando a complexidade e interligação entre as vias e reações metabólicas dos organismos..... **43**

Figura 6 - Representação da cascata das abordagens "ômicas"..... **45**

Figura 7 - Representação da órbita precessional e orientação do *spin* do átomo submetido a um campo magnético..... **47**

Figura 8 - Representação das possibilidades de orientação do núcleo em relação ao campo aplicado..... **48**

Figura 9 - Representação esquemática dos spins dos núcleos após aplicação de campo magnético **49**

Figura 10 - Representação das curvas de RMN e interferograma FID **50**

Figura 11 - Colheita do líquido sinovial da articulação hígida de equino..... **59**

Figura 12 - Imagens radiográfica e ultrassonográfica de lesão de OCD em articulação tibiotársicas de equino..... **60**

Figura 13 - Colheita do líquido sinovial de articulação apresentando OCD, de equino submetido à artroscopia..... **61**

Figura 14 - Preparação das amostras para realização da análise metabolômica..... **62**

Figura 15 - Ilustração do interior do aparelho de ^{1}HRMN **63**

Figura 16 - Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III 500.0 MHz do Instituto de Química da UNICAMP..... **64**

Figura 17 - Espectro geral de articulação hígida, com a identificação dos metabólitos presentes no líquido sinovial..... **69**

Figura 18 - Espectro geral de articulação com OCD sintomática, com a identificação dos metabólitos presentes no líquido sinovial..... **69**

Figura 19 - Espectros referentes à região alifática de 0.6 a 2.0 ppm de dez amostras de líquido sinovial de articulações (A) hígidas, (B) com OCD assintomática e (C) com OCD sintomática..... **71**

Figura 20 - Espectros referentes à região aromática de 6.5 - 8.0 ppm de dez amostras de líquido sinovial de articulações (A) hígidas, (B) com OCD assintomática e (C) com OCD sintomática..... **72**

Figura 21 - Comparação da intensidade dos espectros na região de 0.86 a 0.96 ppm, correspondente à leucina e isoleucina..... **75**

Figura 22 - Comparação da intensidade dos espectros na região de 0.97 a 1.0 ppm, correspondente à valina..... **75**

Figura 23 - Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 1.08 a 1.1 ppm correspondente ao propilenoglicol; de 1.12 a 1.14 ppm referente ao etanol e de 1.14 a 1.16 ppm correspondente ao 3-hidroxibutirato **75**

Figura 24 - Comparação da intensidade dos espectros na região de 1.26 a 1.3 ppm, correspondente ao lactato..... **77**

Figura 25 - Comparação da intensidade dos espectros na região de 1.41 a 1.44 ppm, correspondente à alanina..... **77**

Figura 26 - Comparação da intensidade dos espectros na região de 1.6 a 1.7 ppm, correspondente à leucina..... **77**

Figura 27 - Comparação da intensidade dos espectros na região de 1.86 a 1.88 ppm, correspondente ao acetato..... **78**

Figura 28 - Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 1.98 ppm correspondente à N-acetilglutamina; de 2.02 a 2.05 ppm referente à N-acetilglucosamina e de 2.05 a 2.1 ppm correspondente à glutamina..... **78**

Figura 29 - Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 3.32 ppm correspondente ao piruvato; de 2.35 referente ao 3-hidroxibutirato, e de 2.36 a 2.43 ppm correspondente à glutamina..... **78**

Figura 30 - Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 2.45 a 2.5 ppm e de 2.61 a 2.67 ppm correspondente ao citrato; e 2.57 a 2.61 ppm referente à metionina **30**

Figura 31 - Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 3.03 ppm correspondente à creatina e creatinina e de 3.14 ppm

correspondente à dimetilsulfona..... **80**

Figura 32 - Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 3.65 ppm correspondente à glicina; de 3.6 ppm referente à valina e de 3.66 ppm correspondente ao glicerol..... **80**

Figura 33 - Comparação da intensidade dos espectros na região de 3.65 a 3.85 ppm correspondente à glicose..... **81**

Figura 34 - Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 6.85 e 7.15 ppm correspondentes à tirosina; de 6.93 ppm referente à t-metil histidina; de 6.98 ppm referente à histidina e de 6.97 a 7.9 ppm correspondentes ao composto aromático..... **81**

Figura 35 - Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 7.25 a 7.4 ppm correspondente à fenilalanina; de 7.55 ppm referente a t-metil histidina e de 7.7 ppm correspondente à tirosina..... **81**

Figura 36 - Espectros de RMN ^{1}H das amostras antes (à direita) e após (à esquerda) a correção dos desalinhamentos utilizando o método de *bucketing* otimizado..... **82**

Figura 37 - Gráfico de escores da Análise da Componente Principal das 74 amostras de líquido sinovial de acordo com as componentes 1 (PC1) e 2 (PC2). (PC2) componentes principais obtidas na PCA do conjunto de dados..... **83**

Figura 38 Gráficos de pesos relativos à primeira (PC1) e à segunda (PC2) componentes principais obtidas na PCA do conjunto de dados..... **84**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Metabólitos e seus respectivos deslocamentos químicos comuns ao líquido sinovial de articulações hígidas e com OCD sintomática e assintomática **66**

Tabela 2 - Metabólitos e seus respectivos deslocamentos químicos presentes, exclusivamente, no líquido sinovial de articulações com OCD sintomática ou assintomática **68**

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

α – sentido de rotação do núcleo de *spin* + 1/2

β – sentido de rotação do núcleo de *spin* – 1/2

δ – Delta

$\vec{\mu}$ - Vetor momento magnético

$\vec{B}_0$ - Vetor campo magnético

$\vec{M}$ - Vetor magnetização

AH – Ácido hialurônico

AR – Artrite reumatóide

AP – Artrite psoriásica

B – Campo magnético

Ca - Cálcio

-CH_3- – Radical metila

Cl – Cloro

COMP – *(Cartilage Oligomeric Matrix Protein)* Proteína oligomérica da matriz cartilagínea

Coll2-1 – Fragmentos de colágeno Tipo II

CP II – (*Carboxypropeptide of type II collagen)* Carboxipropeptídeo do colágeno Tipo II

CPMG – Carr Purcell Meyboom Gill

CS – Condroitim sulfato

CW – Onda continua (*continuous wave)*

D_2O – Água deuterada

$DMSO_2$ - Dimetilsulfona

E – Energia do isótopo de hidrogênio

ΔE - Variação de energia

EGG - Éter-gliceril-guaiacol

FID – *Free Induction Decay*

h – Constante de Planck

^1H – Próton de hidrogênio

^{1}H RMN – Ressonância magnética nuclear de prótons de hidrogênio

H_2O – Água

HOCl – Ácido hipocloroso

HPLC – (*High Performance Liquid Chromatography)* – Cromatografia líquida de alta performance

Hz – Hertz

I – Isótopo

IL-1β - Interleucina -1Beta

IL-6 – Interleucina -6

K - Potássio

kg – Kilogramas

KS – Keratam sulfato

KWPN – Raça Sela Holandesa

LB – Linha de base

LS – Líquido sinovial

M – Magnetização resultante

MEC – Matriz extra-celular

Mg - Magnésio

mg - Miligramas

MHz – MegaHertz

Na - Sódio

NaOCl – Hipoclorito de sódio

OA – Osteoartrite

OCD – Osteocondrite Dissecante

P - Fósforo

PCA – (*Principal Component Analysis)* Análise da Componente Principal

PGE-2 – Prostaglandina E_2

ppm – Partes por milhão (Hz/MHz)

rad s^{-1} – Radianos por segundo

rpm – Rotações por minuto

s – Segundos

T – Tesla

t_1 – Tempo de relaxação longitudinal

t_2 – Tempo de relaxação transversal

TNFα - Fator de necrose tumoral alfa.

V_0 – Frequência angular

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 22

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 23

2.1 COMPONENTES ARTICULARES..... **23**

***2.1.1Cartilagem Articular*..... 23**

***2.1.2 Condrócitos*..... 24**

***2.1.3 Matriz Extracelular*..... 25**

***2.1.4 Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem (COMP)*..... 28**

***2.1.5 Membrana Sinovial*..... 28**

***2.1.6 Líquido Sinovial*..... 29**

2.2 PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRAL..... **30**

2.3 OSTEOCONDRITE DISSECANTE..... **32**

***2.3.1 Patogenia da OCD*..... 33**

***2.3.2 Sinais Clínicos e Diagnóstico da OCD*..... 35**

***2.3.3 Exames de Diagnóstico por Imagem Utilizados na OCD*..... 36**

***2.3.4 Tratamento da OCD*..... 37**

***2.3.5 Prognóstico da OCD*..... 38**

2.4 BIOMARCADORES NA OCD..... **39**

2.5 ANÁLISE METABOLÔMICA..... **42**

2.6 CONCEITOS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR..... **46**

***2.6.1 Transformada de Fourier*..... 50**

***2.6.2 Deslocamento Químico*..... 51**

2.7 APLICAÇÃO CLÍNICA DA ^{1}H RMN..... **51**

***2.7.1 Aplicações na Medicina*..... 52**

***2.7.2 Aplicações na Medicina Veterinária*..... 54**

3. OBJETIVOS..... 56

3.1 OBJETIVO GERAL..... **56**

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... **56**

4. JUSTIFICATIVA..... **57**

5. MATERIAL E MÉTODO..... **58**

5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS..... **58**

5.1.1 Articulações hígidas..... **58**

5.1.1.1 Critérios de Inclusão..... **58**

5.1.1.2 Colheita de Líquido Sinovial..... **59**

5.1.2 Articulações apresentando Osteocondrite Dissecante..... **59**

5.1.2.1 Critérios de Inclusão..... **59**

5.1.2.2 Colheita de Líquido Sinovial..... **60**

5.2 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL - ^{1}H RMN..... **62**

5.2.1 Processamento das Amostras de Líquido Sinovial..... **62**

5.2.2 Aquisição dos Espectros de ^{1}H RMN..... **63**

5.2.3 Processamento dos Dados de Espectroscopia..... **64**

5.2.4 Avaliação dos Resultados..... **64**

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... **65**

6 RESULTADOS..... **66**

6.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DAS AMOSTRAS **66**

6.2 COMPARAÇÃODOS METABÓLITOS DIFERENCIAIS ENTRE OS GRUPOS..... **70**

6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... **73**

6.3.1 Análise de Intensidade dos Espectros..... **73**

6.3.2 Análise da Componente Principal (PCA) na Região de 6.8 a 7.8ppm..... **82**

7 DISCUSSÃO..... **85**

7.1 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DIFERENCIAIS..... **86**

7.1.1 Aminoácidos de Cadeia Longa **87**

7.1.2 3-Hidroxibutirato..... **88**

7.1.3 Creatina e Creatinina..... **88**

7.1.4 Composto Aromático **89**

7.1.5 Dimetilsulfona..... **90**

7.1.6 Etanol..... **90**

7.1.7 Glicose..... **91**

7.1.8 Glutamina **91**

7.1.9 N-acetilglutamina e N-acetilglucosamina **91**

7.1.10 Propilenoglicol..... **93**

7.1.11 τ-metil histidina..... **94**

7.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA **96**

7.3 COMPARAÇÃO DA ANÁLISE METABOLÔMICA DE DIFERENTES BIOFLUIDOS NA OCD EQUINA **97**

7.4 COMPARAÇÃO ENTRE A ANÁLISE METABOLÔMICA DO LÍQUIDO SINOVIAL NA OCD E OSTEOARTRITE EQUINAS **97**

7.5 CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS **98**

8 CONCLUSÃO..... **100**

REFERÊNCIAS..... **101**

APÊNDICE A..... **113**

1 INTRODUÇÃO

Problemas relacionados às articulações configuram-se como o maior fator de perda econômica no mercado equino (VAN WEEREN, 2006). A osteocondrite dissecante (OCD) é uma das principais doenças que afetam os equinos jovens e uma das condições incluídas nas Doenças Ortopédicas do Desenvolvimento (JEFFCOT, 1996; McILWRAITH, 2002). Por se tratar de importante afecção articular, a OCD pode ser responsabilizada por perdas econômicas substanciais em decorrência da diminuição do desempenho atlético e reprodutivo dos animais acometidos (ROBERT et al., 2006). Apesar da grande importância econômica e ao bem estar dos animais acometidos, o conhecimento dos mecanismos patofisiológicos na degeneração articular nesta espécie é ainda bastante limitado (SCHLUETER; ORTH, 2004).

A análise dos biomarcadores presentes no líquido sinovial (LS) fornece dados fundamentais acerca das alterações representativas de inflamação e danos à cartilagem articular, mesmo em estágios iniciais de evolução da OCD, nos quais os animais são ainda assintomáticos. Por este fato, o monitoramento do ambiente articular caracteriza-se como uma importante ferramenta para o diagnóstico e intervenção precoces na Osteocondrite dissecante

A ressonância magnética nuclear de prótons (^{1}H RMN), na qual um grande número de metabólitos de baixo peso molecular oriundos de fluidos orgânicos ou tecidos são detectados quantitativamente em uma única análise, fornece um imenso potencial na caracterização do estágio, prognóstico e avaliação da resposta ao tratamento de determinada doença (GOWDA et al., 2008). O emergente campo da metabolômica abrange métodos de avaliação holísticos, simultâneos e em tempo real, dos metabólitos, estabelecendo o perfil metabólico global do líquido sinovial, o que nos permitirá compreender o ambiente articular na OCD em suas alterações relacionadas ao metabolismo e degradação da cartilagem.

No presente estudo objetivou-se estabelecer o perfil metabólico global do líquido sinovial de equinos acometidos por OCD, estudar a aplicabilidade da ^{1}H RMN no diagnóstico da OCD e avaliar a possibilidade de distinção entre os líquidos sinoviais de articulações com OCD sintomática e assintomática. A determinação do perfil metabólico do líquido sinovial de equinos hígidos e

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPONENTES ARTICULARES

2.1.1 Cartilagem Articular

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo altamente especializado que encobre a superfície da extremidade dos ossos longos no interior da cavidade articular. Este tecido tem por função auxiliar no recebimento de carga pelas diartroses, protegendo o osso subcondral de cargas excessivas e distribuindo o estresse mecânico durante os movimentos (KUETTNER, 1992). Juntamente com o líquido sinovial, a cartilagem articular é responsável por proporcionar movimentos com quase ausência de fricção das articulações sinoviais (FRISBIE, 1996). Suas características físicas e mecânicas estão baseadas em sua composição química e atividade metabólica específicas. Trata-se de um tecido conjuntivo único em suas características, por não apresentar em sua composição estruturas vasculares, nervosas ou linfáticas (KUETTNER, 1992). Em sua composição estão presentes os condrócitos imersos em uma matriz extracelular (MEC), a qual fornece as características biomecânicas e fisiológicas inerentes e essenciais ao movimento articular. (HUANG; WU, 2008). Os condrócitos correspondem de 1% a 12% do volume da cartilagem articular, sendo que o restante do conteúdo corresponde a matriz extracelular (MEC) (TABASSI; GARNERO, 2007).

A cartilagem articular é do tipo hialina e possui coloração opaca e esbranquiçada, com áreas de coloração rosada, correspondentes ao osso subcondral subjacente. A espessura da cartilagem varia entre as articulações, localização dentro de uma mesma articulação, nível de carga a qual a região é submetida, e também de acordo com a idade do animal, apresentando geralmente de 1 a 4 mm (FRISBIE, 2006).

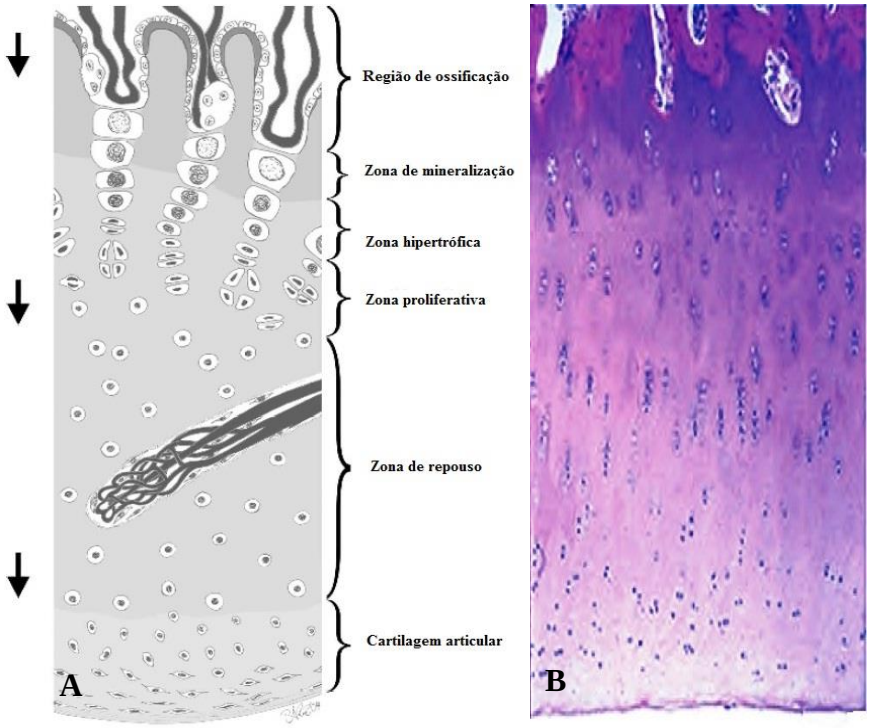
Apesar de outros componentes como o osso subcondral, membrana sinovial, cápsula articular e estruturas ligamentares serem fundamentais para o funcionamento apropriado da articulação, o estado da cartilagem é geralmente tido como parâmetro de definição da saúde desta cavidade. Portanto, o grau de degeneração ou características da reparação da cartilagem definem o nível e progressão das doenças articulares (FRISBIE, 2006).

2.1.2 Condrócitos

Os condrócitos representam pequena fração do volume articular total. Seu metabolismo e morfologia variam de acordo com a sua profundidade na cartilagem, estando mais presentes nas zonas profundas desta. Estas células apresentam processos citoplasmáticos, os quais são responsáveis pela resposta celular às cargas aplicadas. Além do estresse, mudanças na pressão da MEC causadas por alterações bioquímicas também podem direcionar o metabolismo dos condrócitos. O *turnover* dos proteoglicanos da MEC ocorre mais rapidamente do que o do colágeno, sendo que estas taxas podem ser alteradas em caso de doenças, como observado na osteoartrite, onde o aumento na síntese de colágeno e agrecam é um dos primeiros sinais detectados (FRISBIE, 2006). Desta forma, entende-se que a manutenção da matriz cartilagínea é de responsabilidade dos condrócitos, os quais removem e substituem componentes amorfos, com grande habilidade de adição de glicosaminoglicanos à matriz (BANKS, 1968), além de promover a resposta aos danos e às forças supra fisiológicas aplicadas à articulação (HENDREN; BEESON, 2009).

Os condrócitos da cartilagem de crescimento estão organizados em quatro camadas distintas (Figura 1). A *zona de repouso* contém condrócitos que não sofrem grandes modificações ou divisões e que funcionam como precursores da *zona proliferativa*, na qual passam a apresentar uma dinâmica atividade de divisão. Nesta zona altamente proliferativa formam-se colunas de condrócitos que, ao hipertrofiarem, vão segregar-se e manter uma matriz altamente especializada, cuja função é promover a calcificação da cartilagem que serve de modelo à formação de osso por parte dos osteoblastos. Esta é chamada de *zona hipertrófica*. Por fim, na *zona de mineralização* ocorre a invasão vascular e de células osteogénicas que ocupam os espaços livres deixados pelos condrócitos hipertróficos terminais (YTREHUS et al., 2007). O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), produzido pelos condrócitos hipertrofiados, parece ser o responsável pelo crescimento vascular no interior das placas de crescimento (GERBER et al.,1999). Na região de ossificação, os osteoblastos envolvem as superfícies dos septos longitudinais remanescentes formando a camada esponjosa primária que consiste em cartilagem calcificada, osso esponjoso e osso lamelar (YTREHUS et al., 2007).

Figura 1 - Representação esquemática (A) do complexo articular-epifisário da cartilagem com as respectivas zonas dos condrócitos e corte histológico (B) da mesma região.



Fonte: Fonte: (A) Ytrehus et al., 2007; (B) McIlwraith, 2005a.
Legenda: O canal da cartilagem contém a arteríola. As células da zona proliferativa se dividem continuamente e as células da zona hipertrófica aumentam em tamanho, resultando em crescimento no sentido indicado pelas setas. (B). Secção histológica da mesma região da cartilagem articular de equino

2.1.3 Matriz Extracelular

A matéria seca da MEC é composta de colágenos (50%), proteoglicanos (35%) e glicoproteínas (10%). A água é o componente mais abundante da MEC, somando 70% do seu peso em adultos e chegando a até 80% em animais jovens (FRISBIE, 2006). O colágeno tipo II fornece a maior parte dos componentes orgânicos (15-22% da MEC), seguido pelo agrecam (4-7%) e outras proteínas (0,5-1%), incluindo a proteína oligomérica da matriz (COMP) (TABASSI; GARNERO, 2007). Na cartilagem em processo de ossificação há glicogênio, que parece desempenhar um papel na mineralização dos ossos. Ainda, entre os compostos inorgânicos presentes na cartilagem (3 a 5%) encontram-se Ca, Mg, Na, K, P e Cl (BANKS, 1968).

A matriz da cartilagem possui uma complexa rede tridimensional, cruzada e interligada, composta por fibras de colágeno insolúveis, na qual outros componentes mais

solúveis, como os proteoglicanos e glicoproteínas estão presos, integrados ou mesmo quimicamente ligados (Figura 2) (KUETTNER, 1992).

O padrão do colágeno varia de acordo com a sua localização bem como sua profundidade na articulação. Nos casos em que se encontram mais superficialmente são descritos como armaduras, conferindo as características de dureza e resiliência da cartilagem articular. Nestas áreas, o conteúdo de colágeno é bastante alto e suas fibras são de menor calibre (em torno de 31 nm), com orientação paralela à superfície articular. Baseado nesta configuração existem pequenas aberturas na camada superficial da cartilagem (aproximadamente 6 nm) pelas quais pequenas moléculas e íons como a glicose podem passar facilmente. O mesmo não ocorre com moléculas de alto peso molecular, como por exemplo, o ácido hialurônico ou outras grandes proteínas. As fibras de colágeno localizadas na zona intermediária estão orientadas em padrão aleatório e tem diâmetro entre 40 a 100 nm. Já as fibras pertencentes à zona profunda possuem o maior diâmetro e são orientadas perpendicularmente, e cruzam a zona calcificada antes de se fixarem no osso subcondral. O *turnover* do colágeno se dá de maneira semelhante ao dos outros tecidos conjuntivos, porém apresenta a tendência de ocorrer mais lentamente quando comparado aos outros componentes da cartilagem articular (FRISBIE, 2006).

O colágeno tipo II é produzido pelos condrócitos e representa mais de 90% do colágeno da cartilagem articular, caracterizando-se por ser um homotrímero, composto de três moléculas idênticas de colágeno. Os colágenos tipo IX e tipo XI são encontrados em menor quantidade, porém são fundamentais para a organização e estabilidade mecânica do colágeno tipo II. Outros tipos de colágenos, como os tipos VI, XII e XIV também desempenham papel importante na associação entre as fibras de colágeno e outros componentes da MEC, como o ácido hialurônico (McILWRAITH, 2001; FRISBIE, 2006).

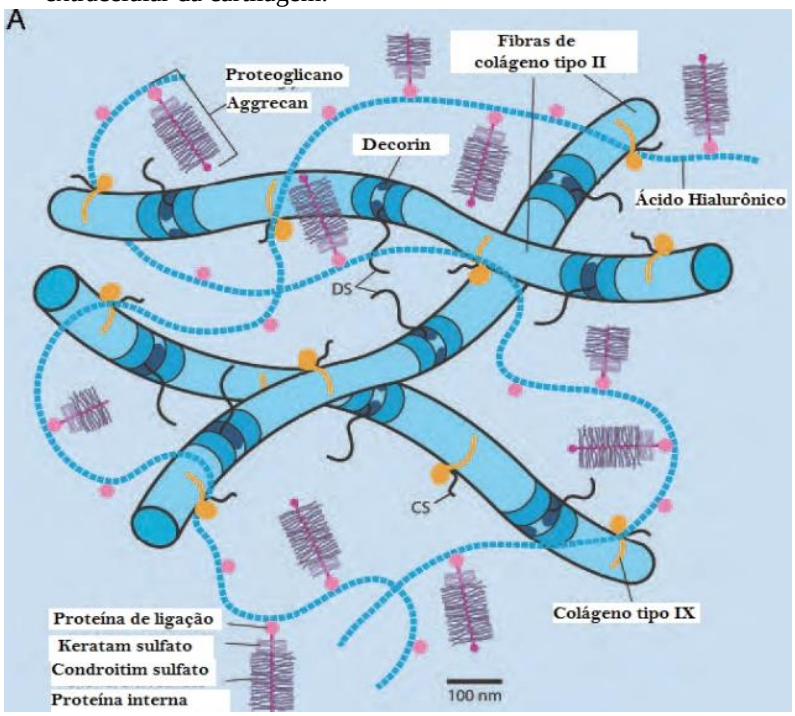
Os proteoglicanos (PG) são outro grande componente da MEC da cartilagem articular, correspondendo a 35% da massa seca. Estas moléculas são resultantes da combinação entre proteínas e glicosaminoglicanos (McILWRAITH, 2005b). Estes componentes têm como principal função a de fornecer resistência e elasticidade às forças compressivas às quais a cartilagem articular é constantemente submetida (FLUGGE et al, 1999). Os proteoglicanos proporcionam à cartilagem a habilidade em sofrer deformações reversíveis. Sua distribuição seletiva em locais específicos, as alterações a que são submetidos com a idade e suas estruturas diferenciadas sugerem que os proteoglicanos apresentam funções bastante especializadas na cartilagem articular (KUETTNER, 1992).

O agrecam é o maior proteoglicano encontrado na MEC, sendo responsável por cerca de 85% dos PG presentes na mesma. É amplamente responsável pela alta resistência à compressão deste tecido quando submetido à carga. O monômero da molécula de agrecam é formado por dois componentes principais: a proteína central, a qual atua como esqueleto de sustentação da molécula, e os glicosaminoglicanos (GAGs), que se fixam radialmente à proteína. As três moléculas de GAGs formadoras do agrecam são: condroitim sulfato, heparam sulfato e keratam sulfato. Na medida em que o animal envelhece e a cartilagem fica mais madura, o condroitim-6-sulfato se sobrepõe ao condroitim-4-sulfato. Os GAGs se fixam covalentemente à proteína central e cerca de 100 moléculas de condroitim sulfato se agregam à porção terminal carboxi da molécula. Da mesma forma, aproximadamente 100 moléculas de keratam sulfato encontram-se próximas à região terminal-*N* deste monômero. Em decorrência das altas cargas negativas associadas aos GAGs, estas moléculas se repelem e atraem água, criando uma pressão positiva (FRISBIE, 2006). A redução do agrecam na cartilagem com osteoartrite pode ser atribuída ao aumento da proteólise e é mediada por diversas proteinases da matriz. (HUANG; WU, 2008).

Os monômeros de agrecam são posteriormente organizados em grandes agregados ao redor de uma molécula de ácido hialurônico. Tais agregados podem ser da ordem de 200 milhões de Daltons e envolvem mais de 100 monômeros de agrecam. A ligação não covalente entre os monômeros de agrecam e hialuronato são estabilizadas por um pequeno grupo de proteínas de ligação (LOHMANDER, 1988).

O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear, hidrofílico, polianiônico de alto peso molecular (FRANCOLI et al., 2010) e se configura como um grande glicosaminoglicano não sulfatado constituído por unidades dissacarídicas repetidas de ácido D-glucurônico e N-acetilglucosamina (LINKER; MEYER, 1954). Apresenta fundamental importância na composição da cartilagem e do líquido sinovial e é produzido pelos condrócitos e sinoviócitos tipo B da membrana sinovial (McILWRAITH, 2001). Entre suas propriedades estão a formação de agregados de proteoglicanos e estímulo da síntese de proteoglicanos pelos condrócitos, além de promover a viscoelasticidade do líquido sinovial e lubrificação dos tecidos moles (McILWRAITH, 2002).

Figura 2 - Representação esquemática dos componentes da matriz extracelular da cartilagem.



Fonte: Adaptado de McIlwraith, 2005a

2.1.4 Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem

A Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem (COMP) é uma glicoproteína pentamérica com, aproximadamente, 500 kDa, responsável pela interação entre os condrócitos e os componente da matriz extracelular (OLDBERG et al, 1992). A composição química desta proteína consiste em aminoácidos, principalmente a asparagina e a glutamina, as quais representam 30% dos seus componentes (HEDBOM et al, 1992). Esta proteína se localiza primariamente na MEC próxima aos condrócitos, e é mais enriquecida nas camadas superficiais. A hipótese atual é que esta molécula esteja envolvida na montagem e reparação do tecido cartilagíneo. Além da COMP, outras proteínas não pertencentes ao colágeno e aos proteoglicanos estão presentes na MEC, sendo elas as proteínas de ligação, a ancorina, a condrocalcina e a trombospondina (KUETTNER, 1992).

2.1.5 Membrana Sinovial

A membrana sinovial consiste em tecido mesenquimal modificado e delimita internamente a cavidade articular. Este tecido consiste em sinoviócitos alinhados e tecido conjuntivo subsinovial. O tecido conjuntivo se une imperceptivelmente à cápsula articular

fibrosa. Os sinoviócitos alinhados formam uma membrana, denominada camada íntima, de espessura de aproximadamente quatro sinoviócitos. A camada íntima é incompleta, sem membrana basal, e recobre a camada sub-íntima, a qual pode ter característica fibrosa, areolar ou adiposa, dependendo do tecido ao qual está associada (BANKS, 1968).

Os sinoviócitos da membrana sinovial apresentam-se como células alinhadas e possuem funções secretórias e fagocíticas. São responsáveis pela síntese do ácido hialurônico, o qual é secretado para o líquido sinovial pela membrana plasmática (TODHUNTER, 1996).

A camada íntima configura-se como a fina barreira entre o fluido intravascular e intersticial da sub-íntima e o líquido sinovial. A ausência de membrana basal e a proximidade dos capilares à superfície da camada íntima (5 a 10 µm) facilitam a troca de solutos, a qual é regida pela diferença das pressões hidrostáticas e coloidosmóticas entre o plasma e o líquido sinovial (TODHUNTER, 1996).

2.1.6 Líquido Sinovial

A ausência de suprimentos vasculares, linfáticos e neurais torna a cartilagem articular um tecido único e determina a dependência deste tecido ao processo de difusão para o fornecimento de nutrientes e remoção de detritos (FRISBIE, 2006). O líquido sinovial (LS) é considerado um ultrafiltrado do plasma e configura-se como o meio exclusivo pelo qual os nutrientes chegam à cartilagem articular. Não há evidências que sustentem a contribuição metabólica dos leitos vasculares do osso subcondral para a cartilagem articular. Além da função de nutrição da cartilagem, o líquido sinovial é fundamentalmente responsável pela lubrificação e proteção da superfície articular. Sua alta viscosidade, conferida principalmente pela presença do ácido hialurônico, é sua principal característica (BANKS, 1968).

O endotélio da membrana sinovial impede que moléculas de alto peso molecular saiam dos capilares sinoviais. Mesmo para as pequenas moléculas existe uma barreira à permeabilidade, mantida pelo pequeno espaço entre os sinoviócitos alinhados e pela própria composição da matriz extracelular (TODHUNTER, 1996). Os solutos difundem-se dos vasos da camada sub-íntima da membrana sinovial, passando pela camada íntima e alcançando o líquido sinovial, chegando à matriz da cartilagem, até finalmente alcançarem os condrócitos (FRISBIE, 1996). Os componentes do plasma tais como oxigênio, dióxido de carbono e proteínas, com peso molecular tipicamente < 10 kDa, conseguem atravessar o endotélio da camada sub-íntima por difusão simples, participando da composição do LS. A glicose é capaz

de atravessar por difusão facilitada, atingindo a articulação de maneira mais rápida que as outras moléculas de baixo peso molecular (TODHUNTER, 1996).

Moléculas de alto peso molecular, como as proteínas, não são capazes de realizar esta travessia e, portanto, em condições normais não estão presentes neste fluido, com exceção do ácido hialurônico e da lubricina que são fornecidos para o líquido sinovial diretamente pelos sinoviócitos. Estas duas proteínas são fundamentais pois funcionam como uma barreira às moléculas grandes, excluindo-as da cavidade articular, e por propiciarem a lubrificação das superfícies articulares (FRISBIE, 2006). Além dos compostos mencionados também são encontrados no LS células mononucleares (sinoviócitos, monócitos e linfócitos) que correspondem a 90% das células encontradas, e leucócitos, perfazendo os 10% restantes (TODHUNTER, 1996).

A caracterização do líquido sinovial em parâmetros como cor, viscosidade, citologia, entre outros, é de longa data considerada uma ferramenta importante no diagnóstico de diversas artropatias (BANKS, 1968). Atualmente, sabe-se que a análise dos biomarcadores presentes no líquido sinovial (LS) fornece dados fundamentais acerca das alterações representativas de inflamação e danos à cartilagem articular, mesmo em estágios iniciais de evolução da OCD, nos quais os animais são ainda assintomáticos. Por este fato, o monitoramento do ambiente articular caracteriza-se como uma importante ferramenta para o diagnóstico e intervenção precoces na OCD (MACHADO et al, 2012).

2.2 PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRAL

O processo que ocorre nos centros ossificação primária nas diáfises dos ossos longos tem início ainda na vida fetal, e no momento do nascimento todas as diáfises já são configuradas como estruturas ósseas. O mesmo não ocorre em centros de ossificação secundária, localizados nas epífises dos ossos longos, os quais permanecem com uma composição parcialmente cartilagínea ao nascimento (VAN WEEREN, 2006).

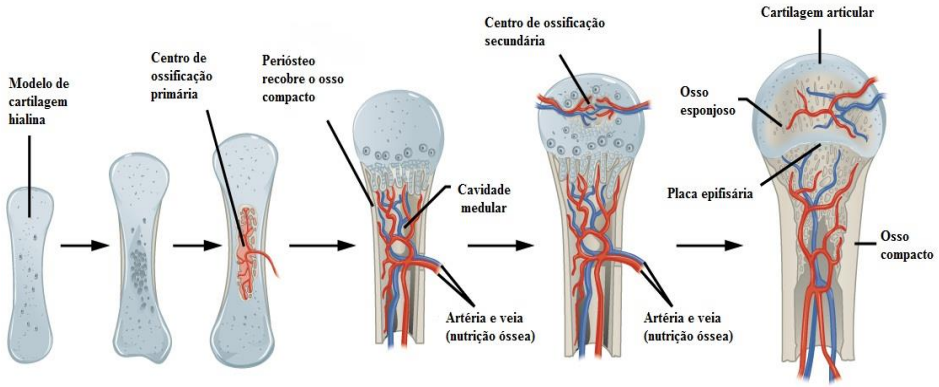
Após o nascimento, o crescimento longitudinal dos ossos longos ocorre a partir das fises ou placas de crescimento, onde se partindo de uma camada germinal de células, os condrócitos proliferam e fixam-se sobre uma matriz extracelular. Estas células inicialmente hipertrofiam e, posteriormente, sofrem apoptose. Essa matriz é utilizada para a aposição de osso primário pelos osteoblastos, oriundos da metáfise óssea. A camada esponjosa inicial sofre remodelamento contínuo sob influência de cargas biomecânicas, durante todo o período

de crescimento do potro. Tal remodelamento tem continuidade durante a fase adulta, com as alterações das cargas biomecânicas, quando o animal é submetido à atividade atlética (VAN WEEREN, 2006). Assim, o processo de remodelamento da cartilagem, seguido de sua calcificação, deposição de osso primário, e os sucessivos remodelamentos, até a formação de osso esponjoso, é conhecido como ossificação endocondral (Figura 3) (HURTIG; POOL, 1996).

O aumento em diâmetro dos ossos longos durante o crescimento é produto de um processo simultâneo e coordenado ao de remodelamento, pelo crescimento por aposição a partir do periósteo. Este processo resulta na formação de ossos corticais compactos (VAN WEEREN, 2006). O fechamento da placa de crescimento nos ossos tem início por volta dos três meses de idade do potro e é considerado completo antes dos três anos de idade (McCOY et al., 2013).

Na região epifisária dos ossos longos o processo de remodelamento é semelhante ao que ocorre na região fisária, mas não está completamente finalizado quando o animal nasce. Em algumas articulações, no momento do nascimento, haverá um anel de cartilagem ao redor dos centros de ossificação, conectando a cartilagem articular à placa de crescimento. A ossificação deste anel de cartilagem se dá primeiramente na borda da fise e no perímetro da epífise. A espessa massa de cartilagem na porção articular da epífise funciona de maneira similar à placa de crescimento, no qual os processos simultâneos de crescimento, remodelamento e ossificação ocorrem, resultando em uma camada mais fina de cartilagem nos animais mais velhos. É nesta fase que as lesões características da OCD se desenvolvem (VAN WEEREN, 2006).

Figura 3 - Esquema representativo do processo de ossificação endocondral.



Fonte: http://cnx.org/content/m44789/latest/
Legenda: O processo tem início na cartilagem hialina e resulta em osso compacto e esponjoso e a cartilagem articular avascular em sua extremidade.

2.3 OSTEOCONDRITE DISSECANTE

A osteocondrose é um distúrbio comum da cartilagem de crescimento nos animais domésticos e no homem (BOHNDORF, 1998). Nos animais domésticos está descrita em porcos (DEWEY, 1999), cavalos (McILWRAITH, 2002), bovinos (JENSEN et al., 1981), cães e gatos (RALPHS, 2005) e ratos (KATO, 1987).

Trata-se de processo resultante de uma falha na ossificação endocondral, ou seja, uma área da cartilagem de crescimento que não sofre transformação em matriz calcificada e nem invasão vascular, e consequentemente não é convertida em osso. Este processo pode vir a comprometer tanto a cartilagem do complexo articular-epifisário quanto o disco epifisário de crescimento (McILWRAITH, 1998; EKMAN; CARLSON, 1998).

A OCD tem sido amplamente estudada desde meados de 1880, quando o termo foi primeiramente introduzido pelo médico Franz König para descrever a condição caracterizada pela formação de fragmentos osteocondrais livres nas articulações de indivíduos jovens sem a ocorrência prévia de artrite primária ou trauma. Avaliações histológicas subsequentes não corroboraram a hipótese da etiologia inflamatória, sendo posteriormente, sugerida a mudança da terminologia para “osteocondrose”, como sugerido por Howald em 1942 (revisão em EDMONDS, 2013). Na literatura clínica, quando há a presença de fragmentos osteocondrais, a condição é geralmente descrita como osteocondrite dissecante, apesar da nomenclatura osteocondrose dissecante ser mais apropriada. Por ser uma terminologia amplamente utilizada, atualmente consideram-se corretos ambos os termos. (McCOY, 2013).

A osteocondrite dissecante não é considerada uma doença debilitante, com exceção dos casos em que a lesão é tão extensa que não possibilite a reparação. No entanto, o transtorno causado por esta enfermidade representa um grande impacto na economia da indústria do cavalo e, em certa medida, ao bem estar do animal, pelo fato de milhares de equinos serem operados todos os anos como parte do tratamento da OCD. Além das perdas econômicas diretas, acredita-se que as perdas indiretas sejam ainda mais substanciais. Animais apresentando sinais radiográficos de OCD perdem seu valor de mercado e muitas vezes não são comercializados. Ainda, estima-se que cerca de 30% dos garanhões em potencial têm a participação vetada na aprovação do *Studbook* da KWPN (registro dos animais da raça Sela Holandesa), um dos mais importantes do mundo, por apresentarem quaisquer evidências de OCD. Desta maneira, além do prejuízo econômico, há uma grande perda da variabilidade genética dos plantéis (VAN WEEREN, 2006).

O exato mecanismo desencadeador desta enfermidade não é totalmente esclarecido, porém é reconhecida a contribuição de alguns fatores no desenvolvimento das lesões, levando à ideia de etiologia multifatorial. Dentre estes se destacam: fatores nutricionais (excesso de ingestão energética e desequilíbrio mineral), endócrinos, genéticos e biomecânicos (GLADE, 1988; NAKANO; AHERNE, 1988; SHOUGAARD et al., 1990; GØNDAHL; DOLVIK, 1993; McILWRAITH, 1993b; PHILIPSSON et al., 1993; CARLSON et al., 1995; HURTIG; POOL, 1996; PHILLIPSON, 1996; EASTER; WATKINS, 1999).

Não há duvidas de que algumas manifestações da osteocondrose tenham um componente genético, mostrado através da avaliação da progênie de garanhões com ou sem lesões osteocondrais (SHOUGAARD et al., 1990).

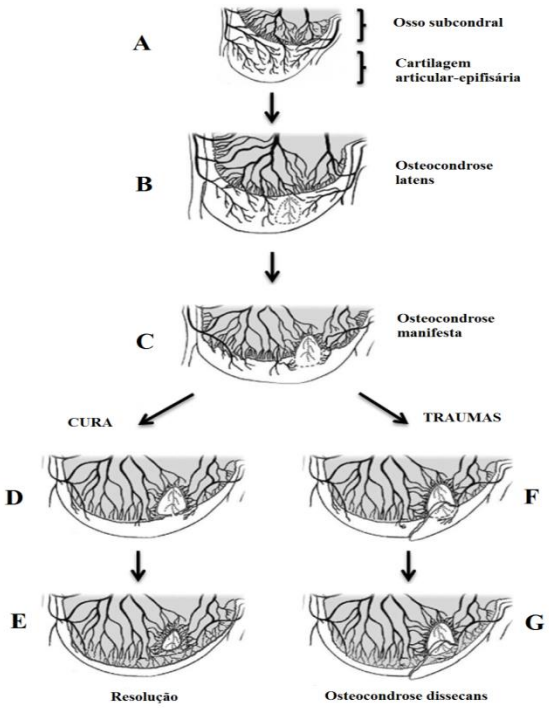
2.3.1 Patogenia da OCD

Atualmente, existem duas hipóteses principais sobre os eventos etiopatológicos responsáveis pelo aparecimento das lesões de OC: a teoria da isquemia local e o papel da cartilagem tipo II (YTREHUS, 2007; LAVERTY; GIRARD, 2013).

A lesão principal da OCD na superfície articular ou fiseal caracteriza-se por falha focal no processo de ossificação endocondral e invasão vascular da cartilagem em crescimento que acaba por não converter-se em tecido ósseo (EKMAN; CARLSON, 1998). Esta alteração pode ser vista macroscopicamente como uma área de cartilagem espessada acompanhada por junção osteocondral irregular. Em casos mais avançados, a cartilagem persistente torna-se macia e avermelhada, e a medula óssea subjacente apresenta-se edematosa e hiperêmica. No entanto, antes mesmo que seja possível essa visualização, a lesão já pode ser caracterizada histologicamente como uma área focal de necrose restrita à cartilagem de crescimento (YTREHUS et al, 2007).

A área focal da cartilagem necrosada que permanece confinada à cartilagem epifisária é geralmente denominada *osteocondrose latens*, enquanto que a presença de uma falha na ossificação endocondral visível macroscopicamente ou ao exame radiográfico é designada *osteocondrose manifesta*. Com a formação de fissura na área necrosada, que se estende pela cartilagem articular formando o fragmento osteocondral, a lesão passa a ser designada *osteocondrose dissecans* (Figura 4) (YTREHUS et al., 2004).

Figura 4 - Diagrama representando a patogenia da osteocondrite dissecante.



Fonte: Adaptado de Ytrehus et al, 2007.
Legenda: (A) Ossificação endocondral normal. (B) Desenvolvimento da lesão de *osteocondrose latens* por falha no suprimento de sangue pelo canal da cartilagem, levando à necrose da cartilagem epifisária. (C) Lesão de *osteocondrose manifesta* aparecendo como um atraso no processo de ossificação. (D) e (E) Cura da lesão de *osteocondrose manifesta* por sua incorporação ao osso subcondral. (F) e (G) Desenvolvimento da o*steocondrose dissecans* em decorrência de traumas, causando o colapso da cartilagem articular nas regiões de necrose da cartilagem epifisária.

Estas observações levaram à conclusão de que a OC não é de forma alguma uma doença estática aparecendo, em claro contraste com as noções anteriormente estabelecidas, como uma entidade extremamente dinâmica na qual as lesões podem regredir e inclusive desaparecer durante os primeiros meses da vida de um cavalo (VAN WEEREN; BARNEVELD, 1999).

A OCD da articulação tibiotársica se desenvolve muito precocemente na vida dos potros e pode ser considerada permanente caso ainda esteja presente quando o animal completar um ano de idade (CARLSTEN et al., 1993). Exames radiográficos sequenciais foram realizados por Dik et al. (1999), em animais da raça Sela Holandesa (KWPN), os quais demonstraram o desenvolvimento e, na maioria dos casos a resolução, de lesões da crista intermédia da tíbia e crista troclear lateral do tálus nos cinco primeiros meses de vida dos potros (DIK et al, 1999). Resultados semelhantes foram apontados por Baccarin et al. (2011), em seu acompanhamento de 46 potros da raça Puro Sangue Lusitano. Destes, 76,08%

apresentavam sinais radiográficos de osteocondrose com um mês de idade, porém, apenas 16,2% apresentaram lesões permanentes aos 18 meses. Esta informação tem fundamental importância na decisão pela intervenção cirúrgica, pois essa modalidade terapêutica deve ser utilizada somente após a confirmação de lesão permanente.

2.3.2 Sinais Clínicos e Diagnóstico da OCD

A OCD é mais comumente diagnosticada nas articulações tibiotársica, femorotibiopatelar e metacarpofalangeana, porém sua ocorrência já foi descrita em praticamente todas as articulações diartrodiais. A articulação tibiotársica é a mais acometida pela OCD, sendo o aspecto dorsal da crista intermédia da tíbia o local mais frequentemente envolvido, seguido do aspecto distal da crista troclear lateral do tálus e do maléolo medial da tíbia (McILWRAITH et al., 1991).

O principal sinal clínico desta enfermidade é a efusão articular, sendo que a claudicação pode estar presente, especialmente quando existem extensas lesões radiográficas, ou quando o fragmento se encontra solto no espaço articular. A idade de aparecimento desta enfermidade varia de acordo com a raça, atividade atlética e condições de manejo. No entanto, em termos de diagnóstico, o paciente típico da OCD é o potro de aproximadamente três anos com efusão articular e claudicação sutil, com desenvolvimento após o início do treinamento, ou ainda os potros de aproximadamente dois anos submetidos a exames de compra, nos quais se detecta a presença do fragmento por exame radiográfico, mesmo que ainda não haja aparecimento da sintomatologia clínica (VAN WEEREN, 2006; McCOY, 2013). Os fragmentos intra-articulares podem resultar em inflamação articular, evoluindo muitas vezes para um quadro de osteoartrite secundária, sendo esta a maior complicação dos casos de OCD (McILWRAITH; NIXON, 1996). Normalmente, há pouca ou nenhuma doença degenerativa acompanhando tais fragmentos, a menos que se encontre esmagado ou solto no interior da articulação (FOERNER, 2003).

No que se refere à incidência das lesões de OCD, estudos relataram a prevalência desta enfermidade em 7,5% (KANE et al, 2000) e 10% (CARLSTEN et al, 1993) dos potros Puro Sangue Inglês de aproximadamente um ano de idade. Um levantamento recente com potros de nove meses a 1,5 ano da raça Standardbred demonstraram a ocorrência da OCD tibiotársica em 22,3% dos 363 animais avaliados. (LYKKJEN et al, 2012). Estudo retrospectivo realizado por Cruz (2011) descreveu que de 75 animais de até 6 anos de idade encaminhados para

artroscopias como parte do tratamento da osteocondrite, a articulação tibiotársica correspondia a 57% do total das articulações acometidas.

As lesões localizadas na crista intermédia da tíbia foram as mais frequentemente encontradas, somando 17,1% deste percentual, seguida dos fragmentos da crista troclear lateral do tálus, somando 3%, e do maléolo medial da tíbia, com 2,2% da ocorrência (LYKKJEN et al, 2012).

Independentemente de sua localização, a alteração primária característica da OCD é uma fissura que separa a cartilagem do osso subjacente, resultando em um fragmento osteocondral livre no espaço articular ou aderido ao osso (McILWRAITH, 1993a; HARRISON; EDWARDS, 1996). Para os fragmentos da crista intermédia distal, os animais podem ou não apresentar efusão e claudicação. As lesões são detectáveis aos seis meses de idade, porém pode ser difícil a diferenciação entre a fise e o osso longo. Para as lesões da crista troclear lateral do tálus, estas podem ser maiores em tamanho e geralmente manifestam sintomas mais intensos, associadas a efusão sinovial e certo grau de claudicação. Fragmentos localizados na região distal da crista troclear medial do tálus são considerados achados artroscópicos, pois estão envolvidos pela membrana sinovial e, portanto, não produzem sinais clínicos. A fragmentação do maléolo medial da tíbia representa um desafio diagnóstico, pois os animais acometidos apresentam leve ou nenhum grau de claudicação e efusão sinovial (FOERNER, 2003).

2.3.3 Exames de Diagnóstico por Imagem Utilizados na OCD

O exame radiográfico é o método de diagnóstico por imagem mais utilizado para a detecção de lesões ósseas estabelecidas, podendo também ser usado para monitorizar a progressão da doença. No entanto, sabe-se que as radiografias não apresentam sensibilidade suficiente para detectar alterações precoces, em especial na cartilagem (BILLINGHURST et al., 2004).

As lesões geralmente são identificadas como defeitos isolados ou defeitos contendo fragmentação. Estudos retrospectivos indicam a predominância da incidência de lesões na crista intermédia da tíbia, seguida do maléolo medial da tíbia. A aparência radiográfica geralmente subestima a extensão do dano visto ao exame artroscópico, particularmente no caso das lesões da crista troclear lateral do tálus. A articulação tibiotársica é a que mais comumente apresenta lesões silenciosas, definidas como achados artroscópicos não aparentes ao exame radiográfico (McILWRAITH, 2013).

A avaliação ultrassonográfica tem se demonstrado uma ferramenta bastante útil no diagnóstico da OCD, como adjuvante às avaliações clínica e complementares de imagem. Este exame deve ser sempre considerado e realizado conjuntamente aos exames diagnósticos de rotina. Sabe-se que em alguns casos este exame promove melhor visualização do fragmento e sua sensibilidade é considerada superior ao exame radiográfico, como ocorre para as lesões contidas no maléolo medial e crista intermédia da tíbia (RELAVE et al, 2009).

A ressonância magnética nuclear é uma modalidade diagnóstica que permite obter informações únicas sobre a morfologia e a bioquímica da cartilagem. Certas sequências de imagem permitem realçar os fluidos orgânicos através do chamado efeito artrográfico, o qual é extremamente útil na identificação de lesões da cartilagem articular (DENOIX; AUDIGIÉ, 2004). Apresenta uma alta sensibilidade na avaliação de alterações de densidade do tecido ósseo tais como esclerose, lise, presença de cistos ou evidência de fraturas, sendo especialmente útil na avaliação do osso subcondral (TAPPREST et al., 2003). É ainda a única técnica de imagem que permite a detecção de lesões degenerativas da cartilagem articular em fase precoce do seu desenvolvimento (KNEELAND, 1997; McCAULEY; DISLER, 1998; SINTZOFF et al., 1999). Suas limitações estão relacionadas a não disponibilidade do equipamento em muitas instituições devido ao seu alto custo de aquisição e implantação da logística necessária, além da necessidade do animal ser submetido à anestesia geral para realização do procedimento, fato este que não ocorre para os exames radiográficos e ultrassonográficos.

2.3.4 Tratamento da OCD

Alguns autores consideravam a possibilidade do tratamento conservativo da OCD, em casos que o animal não apresentasse sintomatologia clínica ou nas articulações que o fragmento apresentasse pequenas dimensões. Este tratamento consistia, basicamente, em repouso e administração de dieta de baixa caloria (McILWRAITH, 1993c, PEREMANS; VERSCHOOTEN, 1997). A opção por esta modalidade de tratamento, na época, era reforçada pelas desvantagens apresentadas pela artrotomia. Atualmente, com a facilidade de acesso à videoendoscopia por médicos veterinários de clínicas em todo o mundo, dificilmente se preconiza o tratamento conservativo para esta enfermidade (VAN WEEREN; JEFFCOT, 2013). No entanto, alguns autores ainda postulam que o tratamento não cirúrgico pode ser recomendado para animais não designados para atividades esportivas, que não apresentem claudicação ou efusão e que possuam fragmentos menores que 2cm de comprimento e 5mm

de profundidade, sem fragmentação verificada ao exame radiográfico. No entanto, sabe-se que na presença de efusão, a opção pelo tratamento conservativo significará o retorno deste sinal sempre que o animal for submetido ao exercício, e que as chances de evolução para a osteoartrite secundária são maiores (McILWRAITH, 2013). Um interessante estudo conduzido por Machado (2010) comprovou que a OCD em equinos com idade superior a um ano apresenta um caráter ativo de degradação da cartilagem articular, como demonstrado pelo aumento dos níveis de condroitim sulfato e ácido hialurônico, independente da extensão da leão e da presença de sinais clínicos. Esta nova compreensão justifica a opção pelo tratamento cirúrgico mesmo em casos de animais assintomáticos.

Baseado nos conhecimentos atuais e na facilidade de acesso à artroscopias, podemos inferir que seja um consenso que o tratamento de eleição é cirúrgico, e consiste na remoção do fragmento osteocondral e curetagem da superfície óssea subcondral alterada através da cirurgia artroscópica (McILWRAITH, 2013). Tendo em vista as lesões de maior extensão e a dificuldade de reparação da cartilagem, modalidades adicionais de tratamento têm sido estudadas no sentido de promover a melhor recuperação da cartilagem e fixar grandes fragmentos osteocondrais (NIXON, 2005).

Apesar de amplamente estudados, pouco foi conseguido no sentido de melhorar a qualidade de reparação e controlar a formação de fibrocartilagem na lesão. Defeitos induzidos experimentalmente demonstram cicatrização através do influxo de tecido de granulação, caracterizado pelo colágeno tipo I e II, além de proteoglicanos e agrecam. Desta maneira, forma-se um tecido semelhante à cartilagem hialina, porém com qualidades biomecânicas e bioquímicas que pouco se assemelham ao tecido original (FRISBIE, 2006).

2.3.5 Prognóstico da OCD

O prognóstico para retorno à atividade atlética após intervenção cirúrgica depende das articulações acometidas e do tamanho e número de lesões, variando de moderado a bom para a maioria das articulações envolvidas (VAN WEEREN, 2006). Apesar de muitos animais serem capazes de retornar ao exercício na capacidade pretendida por seus treinadores e proprietários após o tratamento cirúrgico, o prognóstico para a futura carreira atlética torna-se menos favorável de acordo para lesões extensas (FOLAND et al., 1992; FORTIER; NIXON, 2005).

McIlwraith et al., (1991) reportaram taxas de sucesso após o tratamento por artroscopia de 73% para animais de corrida e de 83% para equinos submetidos a outros tipos

de atividade atlética, com redução da efusão sinovial de 89% para cavalos de corrida e 74% para o segundo grupo. Já uma pesquisa mais recente, conduzida por Brink et al. (2009), demonstrou melhora significativa na avaliação subjetiva da efusão (41%), claudicação (88%) e resposta ao teste de flexão (86%) da articulação tibiotársica de 79 equinos de diferentes raças apresentando OCD, após serem submetidos ao tratamento cirúrgico para remoção do fragmento osteocondral.

Cruz (2011) realizaram acompanhamento do pós-operatório em longo prazo de animais com OCD submetidos ao tratamento cirúrgico. Dos 75 animais avaliados 54% não apresentaram sinais clínicos de efusão ou claudicação no pós-operatório. As taxas se mostraram mais favoráveis para animais de 3 a 4 anos com 100% de remissão da sintomatologia. Índices menos expressivos foram apresentados para os animais maiores de 6 anos de idade, dos quais apenas 35,29% apresentaram melhora dos sinais clínicos.

Nem todas as lesões de OCD resultam em sinais clínicos de efusão e claudicação. No entanto, quando estes sinais estão presentes, se não forem devidamente tratados, aumentam dramaticamente a chance de desenvolvimento da osteoartrite secundária (FORTIER; NIXON, 2005). É importante salientar que a intervenção cirúrgica deve ser instituída precocemente no curso da doença para que a cápsula articular não esteja demasiadamente alongada pela distensão crônica, o que tornaria a resolução da efusão menos provável. Além disso, o procedimento deve ser realizado antes da instalação do processo articular degenerativo de osteoartrite secundária, o que determina um melhor prognóstico para o animal (FOERNER, 2003). No entanto, deve-se respeitar a idade mínima de cinco meses para certificar-se de que se trata de lesão permanente (McILWRAITH, 2013).

2.4 BIOMARCADORES NA OCD

Tendo em vista que a patogenia e mecanismos de instalação e progressão da OCD são ainda pouco esclarecidos, e que os métodos diagnósticos disponíveis nem sempre apresentam boa correlação com severidade da lesão cartilagínea, a abordagem em nível molecular se faz necessária (VAN WEEREN, 1996; VERWILGHEN et al, 2011). Biomarcadores, marcadores bioquímicos e marcadores moleculares são termos utilizados para descrever indicadores diretos ou indiretos das alterações no *turnover* de tecidos. Moléculas que são produtos normais e subprodutos dos processos metabólicos que ocorrem nestes tecidos também tem sido utilizadas como marcadores (McILWRAITH, 2005b). Marcadores biomoleculares do

metabolismo da cartilagem e do osso subcondral presentes no líquido sinovial tornaram-se importantes ferramentas no acompanhamento das lesões articulares, fornecendo dados para o estabelecimento do prognóstico e direcionando a conduta do veterinário (MACHADO et al., 2012). Ao longo das últimas décadas, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de desenvolver marcadores bioquímicos e imunológicos que sejam capazes de identificar e quantificar os produtos da degradação da cartilagem articular, objetivando-se correlacionar níveis elevados destes marcadores no líquido sinovial e no soro com o estágio da doença, visando avaliar sua eficácia e aplicabilidade no monitoramento da terapia (RAY et al., 1996).

O LS tem sido selecionado como alvo de diversas pesquisas por ser amplamente estudado e implicado como mediador da progressão da doença, pelo fato de que nele estão presentes citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral (TNF-α), Interleucina-1ß (IL-1ß) e Interleucina 6 (IL-6). Isto sugere que uma alteração no ambiente articular possa fornecer um conjunto de biomarcadores para o diagnóstico e para o acompanhamento da progressão das artropatias (McILWRAITH, 2005b). Particularmente no caso da OCD, os biomarcadores podem revelar a necessidade de intervenção cirúrgica antes mesmo da presença de sinais clínicos e antes que animal inicie sua vida atlética (VERWILGHEN et al, 2011).

Os tipos de biomarcadores mais utilizados são aqueles relacionados à degradação da cartilagem, principalmente os que se referem à quebra do colágeno e dos glicosaminoglicanos. Pelo fato da cartilagem ser ricamente composta de condroitim sulfato (CS) e por sua viscosidade depender intimamente da concentração e tamanho da molécula de ácido hialurônico (AH), a análise destes glicosaminoglicanos tem sido muito utilizada na avaliação da OCD (MACHADO et al., 2012). Além destes componentes, o keratam sulfato (KS), o epítopo 846 do condroitim sulfato (marcador da síntese do agrecam) e o CP-II (marcador da síntese do colágeno tipo II) já foram descritos. Ray et al. (1996) demonstraram o aumento dos níveis do CP-II e do epítopo 846 em articulações apresentando fragmentos osteocondrais, porém sem alteração da concentração do KS, comparando-se animais hígidos e acometidos por OCD.

Billinghurst et al., (2004) foram capazes de identificar a presença da OCD utilizando-se apenas dos marcadores biológicos. Em potros de 5 meses de idade, os biomarcadores de degradação do colágeno (fragmentos de colágeno tipo I e II) e mineralização óssea (osteocalcina) foram considerados indicadores positivos da OCD. Em potros mais velhos com lesões permanentes, a severidade da OCD estava intimamente ligada à concentração dos biomarcadores de redução da formação óssea e de aumento na síntese de cartilagem (pró-

colágeno tipo II). A habilidade dos biomarcadores em indicar a severidade da OCD, foi dependente do estágio da doença e apresentou correlação positiva com o exame radiográfico (BILLINGHURST et al., 2004).

Verwilghen et al (2011) verificaram excelente correlação entre os marcadores de degradação da cartilagem articular Coll2-1 e Coll2-1NO_2 e a avaliação da severidade da lesão de OCD em animais de 3 a 5 anos através da artroscopia. De Graw et al., (2006) avaliaram as alterações presentes no metabolismo da matriz cartilagínea de animais de 2 a 4 anos com OCD sintomática ou assintomática. Não foram detectadas alterações no *turnover* do colágeno ou proteoglicanos destes animais durante a avaliação, que seria o período correspondente ao desenvolvimento dos sinais clínicos da OCD na crista intermédia da tíbia. No entanto, foram observadas concentrações aumentadas do leucotrieno B_4 e da $PGE_{2,}$ em animais doentes quando comparados ao grupo controle, de articulações sem OCD, implicando que tais mediadores contribuem para o início dos sinais clínicos (DE GRAW, 2006). Além destas moléculas, a avaliação de biomarcadores como a COMP, ARGS (Alanina-Arginina-Glicina-Serina do agrecam)- e citocinas tem sido amplamente utilizados (CATTERALL, 2010).

É cada vez mais evidente que as alterações que ocorrem no metabolismo da cartilagem desempenham um papel fundamental no mecanismo molecular da OCD. No entanto, a questão principal que permanece é se os eventos estudados são primários ou secundários ao processo de desenvolvimento desta doença, visto que seu diagnóstico, em geral, é feito tardiamente (YTREHUS et al., 2007). Este fato salienta a importância de ferramentas para o diagnóstico durante os estágios iniciais e, geralmente, assintomáticos da OCD. Como as perturbações metabólicas ocorrem antes das alterações no genoma e proteoma, a análise metabolômica através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (^{1}H RMN) possivelmente oferece uma janela precoce para detectar alterações no perfil bioquímico do início e progressão da doença, podendo ainda direcionar uma gama de potenciais tratamentos (ADAMS et al., 2012).

A avaliação dos metabólitos do LS por esta técnica apresenta vantagens sobre as técnicas laboratoriais supracitadas de determinação de biomarcadores, entre elas: (1) a possibilidade de rápida abordagem da natureza e da concentração de uma grande variedade de componentes endógenos e exógenos simultaneamente, (2) por não ser necessário o conhecimento prévio da composição da amostra a ser estudada e (3) por não ser uma técnica destrutiva da amostra, o que permite sua recuperação e reutilização em outras análises (LACITIGNOLA et al, 2008; NAUGHTON et al., 1993). Ainda, pelo fato das perturbações metabólicas ocorrerem em tempo real, esta avaliação tem a vantagem adicional de indicar o

estado atual e a progressão da doença com precisão, o que se configura como vantagem sobre as técnicas comumente utilizadas de monitoramento das artropatias, como os exames radiográficos e ultrassonográficos, exames estes considerados de baixa sensitividade, capazes de identificar somente alterações em estágios avançados de destruição das estruturas articulares (ADAMS et al., 2012).

A OCD pode acometer qualquer uma das articulações diartrodiais, porém sabe-se que sua incidência se dá de maneira diferente nas articulações, sendo a articulação tibiotársica a que apresenta maior incidência de lesões. (McILWRAITH,1996). Além disso, sabe-se que há variações também no metabolismo, sendo algumas articulações mais metabolicamente ativas, apresentando maior síntese de colágeno e proteoglicanos (HENDREN; BEESON, 2009). Por estas razões, optamos por utilizar apenas a articulação tibiotársica em nosso estudo e por isso, também, esta revisão esteve focada principalmente nesta articulação.

2.5 ANÁLISE METABOLÔMICA

Todos os organismos vivos constituem, em seu conjunto, um sistema estável de reações químicas e de processos físico-químicos mantidos à custa de energia. O processo de obtenção, armazenamento e utilização de energia, e a transformação de precursores obtidos do meio em compostos característicos de cada organismo são efetuados por uma intrincada rede de milhares de reações químicas e constituem o que conhecemos por metabolismo (Figura 5) (MARZZOCO; TORRES, 2007). O termo metabolismo é definido essencialmente como uma série de reações químicas interligadas, com início com uma molécula em particular, a qual é convertida em uma ou mais moléculas diferentes, obedecendo a um padrão definido. O metabolismo pode ser dividido em duas categorias: (1) reações que transformam combustíveis em energia celular (catabólicas), e (2) reações que necessitam de energia para ocorrer (anabólicas), como demonstrado a seguir:

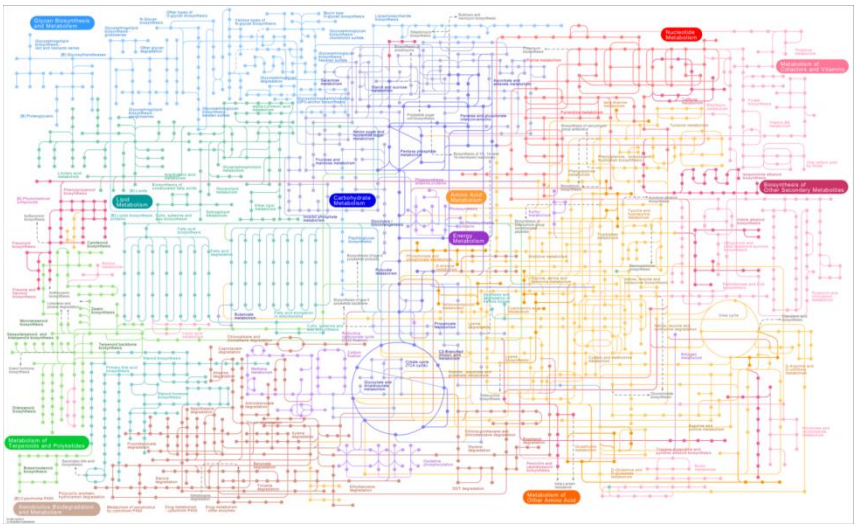
(1) Combustíveis (carboidratos, gordura) → CO2 + H2O + energia utilizável

(2) Energia + pequenas moléculas → moléculas complexas

Todas as células transformam energia, extraindo-a do ambiente e a utilizando na conversão de moléculas simples em componentes celulares. Um pequeno número de carreadores ativados, como o ATP, NADH e Acetil CoA são comuns a diversas vias metabólicas. O metabolismo é regulado pelo controle da quantidade de enzimas, suas

atividades catalíticas e pelo acesso aos substratos. A compartimentalização dos processos em locais diferentes também pode influenciar este mecanismo regulatório, uma vez que segrega reações opostas, como por exemplo, a oxidação dos ácidos graxos, que ocorre na mitocôndria, em oposição à sua síntese no citosol. Em geral, vias metabólicas opostas são reciprocamente reguladas, como é o caso da gliconeogênese e da glicólise, reguladas de tal forma que uma via esteja quiescente enquanto a outra está altamente ativa (BERG et al., 2002).

Figura 5 - Diagrama demonstrando a complexidade e interligação entre as vias e reações metabólicas dos organismos.



Fonte: BERG et al, 2002

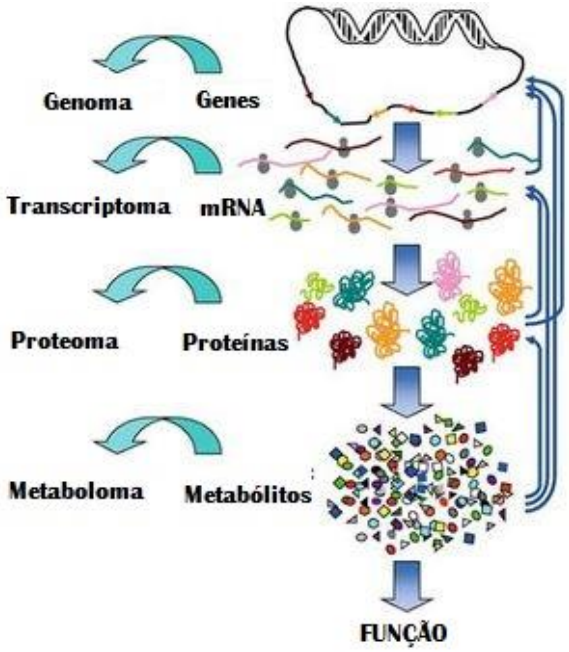
Os metabólitos são considerados os produtos do metabolismo e são representados por um grupo de estruturas de baixo peso molecular (< 2.000 Da), incluindo lipídios, aminoácidos, peptídeos, ácidos nucléicos, ácidos orgânicos, vitaminas, tióis e carboidratos (ZHANG et al., 2012). A análise metabolômica tem por definição a avaliação global de todos os metabólitos presentes em uma amostra de tecido ou fluido (CUPERLOVIC'-CULF et al., 2010). Esta tecnologia emergente tem sido amplamente estudada por revelar desequilíbrios homeostáticos nos sistemas biológicos, com grande capacidade de fornecer informações dos diversos biofluidos como o plasma, sangue total, soro, urina, saliva, líquido cefalorraquidiano, bem como o líquido sinovial (ZHANG et al., 2012). Para avaliações em larga escala, o soro pode ser o tipo de amostra mais indicado por sua facilidade de obtenção. No entanto, o líquido sinovial é superior em demonstrar diretamente a condição do ambiente articular (VAN WEEREN, 2006). O líquido sinovial apresenta grande potencial em determinar os componentes de baixo peso molecular resultantes do processo de degradação da cartilagem

articular sob influência de espécies reativas de oxigênio no processo inflamatório (SCHILLER et al, 1996).

O princípio deste tipo de avaliação em um sistema biológico baseia-se no conceito de que as perturbações causadas pela doença levarão a alterações correlacionadas na concentração de certos metabólitos (PRIORI et al., 2013). Este método tem se demonstrado bastante importante na investigação do estado fisiológico dos organismos, no diagnóstico e descoberta de biomarcadores altamente discriminantes de determinada doença ou estágio desta, e na identificação de vias metabólicas alteradas em decorrência de afecções ou tratamentos instituídos (ZHANG et al., 2012). No campo das doenças articulares a procura por biomarcadores específicos tem sido crescente. Um biomarcador é considerado ideal quando compreende algumas características, a saber: (1) ser específico para a enfermidade, (2) refletir o estágio atual e a progressão da doença, (3) facilitar o diagnóstico precoce e (4) fornecer o prognóstico da mesma (ZHAI; ESHGHI, 2012). Atualmente, na medicina humana, já se consideram alguns metabólitos apresentados na espectroscopia como biomarcadores, como é o caso do citrato, utilizado no diagnóstico de tumores de próstata, e da colina, metabólito referência para o diagnóstico das neoplasias mamárias. Estes testes estão disponíveis clinicamente e com o apoio da maioria das companhias de seguro na Europa e América do Norte (SERKOVA et al., 2007).

Esta nova abordagem pertence à família das ciências “ômicas”, a qual é composta pela genômica, transcriptômica e proteômica (Figura 6), e é caracterizada por ser dirigida por dados, sem o uso de modelos pré-determinados. Através do estudo dos metabólitos é possível definir o estado atual do sistema a ser estudado, como resultado da pressão do ambiente e do potencial genético, o que não é possível através das caracterizações genômicas e proteômicas (PRIORI et al., 2013). Enquanto o genoma, transcriptoma e proteoma podem ser considerados como o fluxo da expressão gênica, caracterizando avaliação de características estruturais, a metabolômica representa o último nível “ômico” de um sistema biológico, refletindo alterações fenotípica e funcionais (PUTRI et al., 2013; RUGGERI et al., 2013).

Figura 6 - Representação da cascata das abordagens “ômicas”.



Fonte: Adaptado de Goodacre, 2005.
Legenda: O fluxograma representa a resposta biológica dos sistemas às doenças, fatores genéticos e perturbações ambientais, utilizadas na investigação dos biomarcadores. As setas verticais à direita indicam as interações regulando a expressão “ômica” específica.

Neste cenário da Biologia Sistêmica os organismos são vistos como dinâmicos e complexos e considera-se que suas respostas e comportamento sejam originados de interações imprevisíveis, considerando-se exclusivamente as propriedades de partes individuais destes sistemas. Isto é especificamente importante no caso das doenças crônicas, nas quais a metabolômica oferece a oportunidade de mapear a via patológica específica do paciente (PRIORI et al., 2013). Considerando-se que os processos metabólicos não ocorrem isoladamente, através da interação dos múltiplos sistemas envolvidos nas doenças emerge uma impressão digital (*fingerprinting)* característica da mesma (FITZPATRICK; YOUNG, 2013).

Existem diversas técnicas para realização da análise metabolômica, sendo que as mais comumente utilizadas são a Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massa (EM) e HPLC (BARTHI et al., 2013; FITZPATRICK; YOUNG, 2013). Dentro do campo da metabolômica em biofluidos destaca-se a técnica de ^{1}H RMN, por se tratar de uma excelente maneira de definir o perfil deste tipo de amostra, caracterizada como uma solução complexa (ZHANG et al., 2012). Nas pesquisas envolvendo artropatias, esta técnica é considerada muito apropriada devido a grande heterogeneidade nos processos

da doença e o reconhecimento de que nenhum biomarcador isolado é capaz de refletir a amplitude de processos temporais e patológicos associados (LAMERS et al., 2005). Portanto, a combinação em um painel de diversos biomarcadores simultâneos, obtidos sob as mesmas condições de temperatura de aquisição dos dados, concentração, manipulação e processamento das amostras, aumentam a capacidade discriminatória deste tipo de teste para a enfermidade em questão (GARNERO et al., 2000). Ainda, no desenvolvimento de ensaios diagnósticos, a análise metabolômica tem a vantagem de apresentar geralmente o mesmo subgrupo de metabólitos relacionados à doença, mantendo sua capacidade discriminativa, bem como sua sensibilidade e especificidade (FITZPATRICK; YOUNG, 2013).

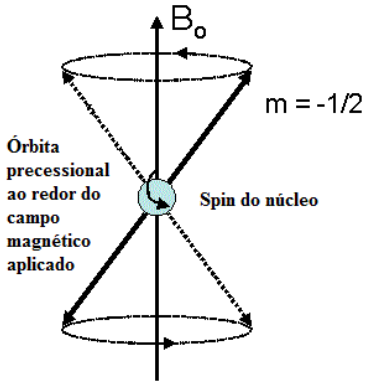
A metodologia envolvida na ^{1}H RMN consiste em três passos: 1) a aquisição de dados experimentais através da espectroscopia; 2) análise estatística multivariada; 3) projeção da informação adquirida para a construção do mapa do paciente (PRIORI et al., 2013). A aquisição das amostras resulta em um espectro contendo picos, representativos da ressonância dos prótons. A grande quantidade de dados obtidos requer o uso de estatística de análises multivariadas, para simplificação e obtenção de um significado a partir destes resultados (FITZPATRICK; YOUNG, 2013). O estabelecimento do perfil metabólico baseado na ^{1}H RMN seguido de técnicas estatísticas de reconhecimento de padrão fornecem informações metabólicas abrangentes dos diversos componentes dos biofluidos, refletindo os níveis de metabólitos endógenos e biomarcadores envolvidos em determinada via celular, a qual pode indicar características tanto fisiológicas quanto patológicas (BARTHI, 2013).

2.6 CONCEITOS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A Ressonância Magnética Nuclear, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) é uma técnica de exame da matéria baseada no conceito de que certos núcleos atômicos são intrinsicamente magnéticos. Apenas um número limitado de isótopos apresenta esta propriedade denominada *spin*, dentre os quais destacamos o hidrogênio (^{1}H), carbono (^{13}C), nitrogênio (^{15}N) e oxigênio (^{17}O) (BERG et al., 2002). O núcleo utilizado para este estudo foi o próton de ^{1}H. A ^{1}H RMN baseia-se na medida da precessão (alteração do eixo de rotação) do *spin* destes núcleos quando submetidos a um campo magnético. Segundo o modelo vetorial clássico, o *spin* do núcleo atômico, sob a ação de um campo magnético, gera um momento magnético representado pelo vetor $\vec{\mu}$. Sendo que para um núcleo de *spin* (I) pode-se ter duas orientações (m) para este momento magnético (SANDERS; HUNTER, 1993).

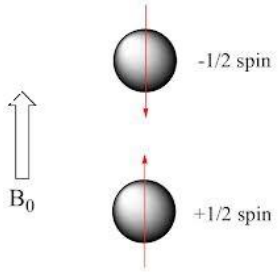
Quando um núcleo atômico interage com um campo magnético uniforme e constante representado pelo vetor $\vec{B}_0$, $\vec{\mu}$ apresenta a tendência a se orientar paralelamente à direção do campo magnético, resultando em um par de vetores $\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0$, que provocam a rotação (precessão, torque) de $\vec{\mu}$ sobre a direção da linha de força do campo magnético $\vec{B}_0$ com uma frequência angular v_0 conhecida, a qual depende exclusivamente do tipo do núcleo e da intensidade do campo magnético $\vec{B}_0$ (Figura 7) (SANDERS; HUNTER, 1993).

Figura 7 - Representação da órbita precessional e orientação do *spin* do átomo submetido a um campo magnético



A técnica RMN não observa um único núcleo, mas estuda estatisticamente a medida do efeito global de uma população de núcleos presentes na amostra do material a ser examinado. É possível, para casos onde o *spin* (I=1/2) definir um vetor magnetização ($\vec{M}$) como resultante da soma vetorial de todos os momentos magnéticos ($\vec{\mu}$) dos núcleos isolados, cada um dos quais poderá ter uma componente paralela a $\vec{B}_0$com a mesma direção (alinhamento paralelo α= +1/2) ou com direção oposta (alinhamento antiparalelo β= -1/2) (Figura 9) (SANDERS; HUNTER, 1993).

Figura 8. Representação das possibilidades de orientação do núcleo em relação ao campo aplicado



Devido à distribuição de Boltzamann o vetor magnetização total nunca é nulo, sendo assim possível mensurá-lo através da diferença entre as populações e entre os estados energéticos gerados pela distribuição de orientações possíveis (SANDERS; HUNTER, 1993).

Todo isótopo magneticamente ativo à RMN ($I \neq 0$) possui uma propriedade intrínseca denominada razão giromagnética (γ). Normalmente medida em rad s^{-1} T^{-1}, essa constante, medida experimentalmente para cada núcleo, expressa a velocidade em que um dado núcleo (isótopo) gira em torno de seu próprio eixo quando submetido a um determinado campo magnético. Sendo assim, pode-se quantificar a energia de cada orientação do isótopo de hidrogênio de *spin* (I=1/2) como sendo (SANDERS; HUNTER, 1993):

$$E_{(\alpha+1/2)}=-1/2 \times \gamma_{(hidrogênio)} \times B_0 \times \hbar$$

($\hbar = h/2\pi$) → onde *h* é a constante de Planck, a qual transforma os resultados em valores de energia em Joules).

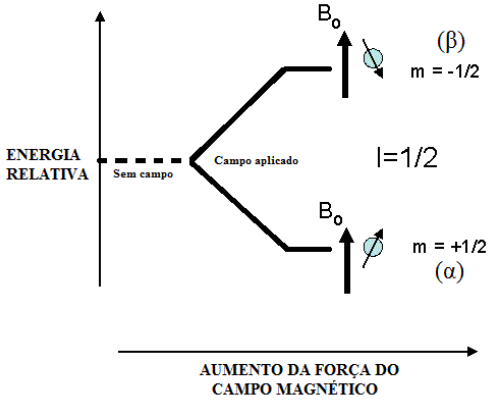
$$E_{(\beta-1/2)}=+1/2 \times \gamma_{(hidrogênio)} \times B_0 \times \hbar$$

Finalmente, é possível associar $\Delta E=E_\alpha-E_\beta= \gamma_{(hidrogênio)} \times B_0 \times \hbar$. Segundo Bohr e Planck toda a diferença de energia pode ser associada a uma variação de frequência, ou seja, $\Delta E=h\ \nu_0$. Igualando estes dois valores de variação de energia pode-se obter a equação fundamental da RMN que diz (SANDERS; HUNTER, 1993):

$$h\ \nu_0= \gamma_{(hidrogênio)} \times B_0 \times (h/2\pi) \text{ ou seja } \nu_0= \gamma_{(hidrogênio)} \times B_0)/(2\pi).$$

Logo, para se medir uma variação de energia entre dois estados m (α → β) basta aplicar a frequência v_0 a uma amostra submetida a um campo magnético B_0, sendo esta frequência sempre da ordem de MHz para campos magnéticos comercialmente utilizados em espectrômetros de RMN (2 a 25T) (SANDERS; HUNTER, 1993).

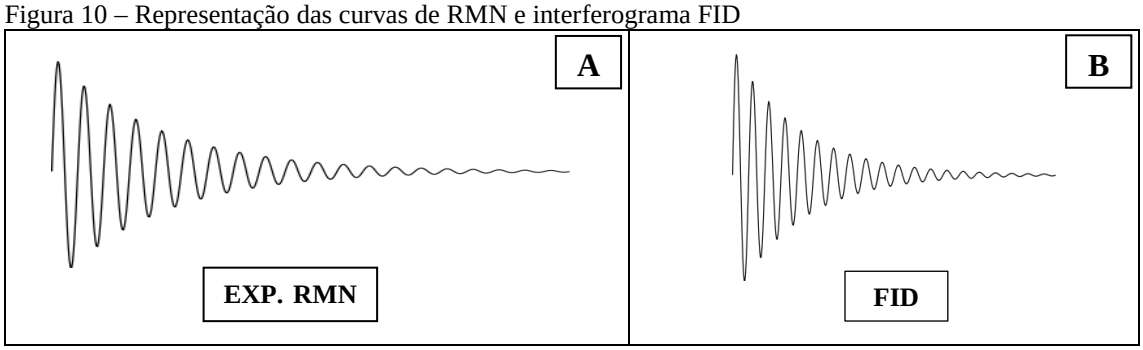
Figura 9 – Representação esquemática dos spins dos núcleos após aplicação de campo magnético



O estado α apresenta uma quantidade ligeiramente inferior de energia e, portanto, é mais populoso, pelo fato de estar alinhado ao campo. Um próton em *spin* α pode ser elevado ao estado β através da aplicação de um pulso de radiação eletromagnética (radiofrequência) , desde que a frequência corresponda à diferença de energia entre os estados α e β.Nestas condições o *spin* se transformará de α para β, obtendo-se, assim, a ressonância (BERG et al., 2002).

Sendo a magnetização resultante M, uma somatória dos vetores μ dos *spins* dos núcleos contidos no material, paralela a direção do campo e no mesmo sentido, pode-se utilizar uma onda de radiofrequência (v) durante um certo tempo (t_p) para mudar a direção desta resultante em relação ao campo B_0, medindo-se então o retorno desta magnetização ao seu estado inicial ao final do tempo t_p. Esta medida resulta em um interferograma denominado FID (do inglês *Free Induction Decay*) que representa o decaimento de energia absorvida pelos núcleos ao longo do tempo durante o processo de restauração da condição inicial da amostra, referente ao estado estacionário ou equilíbrio (Figura 10) (SANDERS; HUNTER, 1993).

Figura 10 – Representação das curvas de RMN e interferograma FID



Depois da perturbação pela radiofrequência (v), o sistema retorna à situação de equilíbrio entre os *spins* dos átomos da amostra e o campo B_0. Este retorno ocorre de acordo com modalidades de tempo dependentes da amplitude de M, a qual diminui segundo o processo de relaxação. O processo de relaxação é definido como o tempo decorrido até que os átomos percam a energia adquirida, retornando ao estado fundamental. Este processo se dá de acordo com dois fenômenos: o de relaxação transversal T_2, ou anulação da componente transversal M_{xy}, e o de relaxação longitudinal T_1, ou recuperação da magnetização longitudinal M_z (SANDERS; HUNTER, 1993).

A constante de tempo T_1, que define o retorno às condições de equilíbrio da componente longitudinal do vetor M é definida como o tempo de relaxação do *spin*-rede, pois atua sobre a energia que é transferida entre o sistema de *spin* e o restante do ambiente, pelo atrito entre os átomos e entre estes com a parede do sistema.
A constante de tempo T_2, que define a anulação da componente transversal do vetor M, é definida como o tempo de relaxação *spin-spin* porque atua nas interações entre os momentos magnéticos dos núcleos isolados, estando relacionada à dinâmica temporal que leva os *spins* atômicos a perderem energia pela rotação e, portanto, a defasarem.
O tempo de relaxação T_2 é sempre menor ou iguale a T_1 (SANDERS; HUNTER, 1993).

2.6.1 Transformada de Fourier

O sinal recolhido pela antena representa a soma dos termos que oscilam com a forma de uma função sinusóide da distribuição da densidade dos prótons do volume adquirido. Esta função periódica e discreta, a qual varia de acordo com o tempo pode ser transformada em uma nova função variando de acordo com a frequência. Esta transformação é denominada de Transformada de Fourier e permite a decomposição de um sinal diferencial em uma soma

infinita de sinusóides (termos) com frequências, amplitudes e fases diferentes da função inicial. A representação dos termos da transformada de Fourier do sinal S(t) permite uma fácil visualização gráfica do espaço no tempo. O núcleo atômico normalmente utilizado nas análises RMN é o próton de hidrogênio, pelo fato de se comportar como um pequeno dipolo magnético, com a vantagem de que estes estão presentes em todos os materiais juntamente com a água, e permitem uma ótima resposta na RMN (SANDERS; HUNTER, 1993).

2.6.2 Deslocamento Químico

Os núcleos das amostras que sofreram perturbação absorvem a radiação eletromagnética em uma frequência passível de mensuração. As diferentes frequências, denominadas deslocamentos químicos são expressas em unidades fracionais δ (partes por milhão – ppm) de Hertz em relação ao deslocamento de um composto padrão (BERG et al., 2002).

A posição na linha de espectro da RMN depende da nuvem eletrônica ao redor do núcleo estudado. A alta densidade de elétrons ao redor dos núcleos atua como uma blindagem magnética, a qual irá se opor ao campo B_0, fazendo com que núcleos ricos em elétrons em sua eletrosfera apresentem posições de deslocamento químico menores do que núcleos com deficiência de elétrons em sua nuvem eletrônica. Núcleos em proximidade às moléculas de oxigênio, por exemplo, tem sua nuvem eletrônica atraída pelo O_2, o que o torna desblindado. Esta desblindagem faz com que o núcleo apresente maior frequência e, portanto, esteja localizado em regiões de maior frequência do espectro. Como exemplo temos um radical – CH_3 o qual exibe, tipicamente, um deslocamento químico de 1.0 ppm, enquanto um próton aromático localiza-se em 7.0 ppm (BERG et al., 2002).

2.7 APLICAÇÃO CLÍNICA DA ^{1}H RMN

Na medicina humana, as pesquisas envolvendo a análise metabolômica estão focadas, principalmente, na determinação dos mecanismos de ação de drogas, no estabelecimento do perfil de doenças, ou na descoberta de biomarcadores (PUTRI et al., 2013). Descrevemos a seguir, alguns dos campos de estudo desta técnica.

2.7.1 Aplicações na Medicina

A análise metabolômica é uma modalidade diagnóstica promissora que deverá melhorar as abordagens atuais de identificação de apenas um biomarcador por ensaio, sendo capaz de avaliar bioassinaturas metabólicas que são resultado de alterações bioquímicas globais na doença. Este fato é especialmente relevante para as condições que requerem tratamentos precoces. Um desses casos é a isquemia aguda do miocárdio, na qual pacientes podem se apresentar com dores agudas no peito, porém sem os sinais clássicos de isquemia, como um eletrocardiograma inconclusivo e valores normais de troponina. Este cenário é desafiador para o clínico e por isso a pesquisa na busca de biomarcadores precisos para esta doença tem sido amplamente realizadas (BODI et al., 2013).

A análise metabolômica é, também, um método promissor no diagnóstico do câncer, por seu caráter pouco invasivo e por sua alta sensibilidade (PUTRI, 2013). A espectroscopia de 1H RMN fornece informações valiosas a respeito do metabolismo de tumores malignos e sua efetividade está baseada na detecção de níveis elevados metabólitos característicos, como é o caso da colina, tida como um dos principais marcadores da atividade tumoral (NEGENDANK, 1992). Em tumores cerebrais, a concentração de compostos contendo colina, inositol, alanina, glicina e fosforietanolamina aumentam de acordo com a malignidade dos tumores (KINOSHITA; YOKOTA, 1997). As concentrações aumentadas de lactato e alanina nas células pulmonares de já foram correlacionadas com o câncer de pulmão (FAN et al. (2009). Já para o câncer de vesícula biliar, os compostos colina, aminoácidos, taurina e lactato foram responsáveis por determinar a malignidade dos tecidos (BHARTI et al, 2013).

Torregrossa et al. (2012) verificaram grande eficácia no diagnóstico de tumores de tireoide. A avaliação metabólica do tecido tireoidiano foi capaz de diferenciar nódulos tireoidianos de lesões tumorais. Ainda, o aumento nas concentrações de fenilalanina, taurina e lactato, bem como a redução da colina e inositol foram definitivas para o estabelecimento do diagnóstico diferencial dos tumores malignos quando comparados aos benignos.

Além do câncer, a análise metabolômica tem sido utilizada em doenças do sistema nervoso central e distúrbios psiquiátricos. Por se tratarem de doenças nas quais há dificuldade em estabelecer um critério de diagnóstico quantitativo, acredita-se que a análise metabolômica seja fundamental para o reconhecimento do painel de biomarcadores para o diagnóstico e confirmação dos efeitos do tratamento (PUTRI, 2013).

Estudos utilizando a avaliação dos metabólitos do líquido cefalorraquidiano de pacientes esquizofrênicos revelou um desequilíbrio na homeostase da glicose, com clara

distinção entre indivíduos doentes e sadios. Ainda, o espectro de mais da metade dos pacientes retornou aos níveis de normalidade após o tratamento com drogas antipsicóticas (HOLMES et al., 2006). A procura por biomarcadores que definam o diagnóstico de doenças do sistema nervoso central inclui também o autismo (RUGGERI et al., 2013), transtorno bipolar e depressão (BUSTILLO, 2013).

No campo das artropatias, a espectroscopia ^{1}H RMN tem sido utilizada na avaliação das diferentes doenças articulares, como a osteoartrite, artrite reumatóide, artrite séptica e gota (VAN DER WIETMARSCHEN et al., 2012; HUGLE et al., 2012; ADAMS et al., 2012; PRIORI et al., 2013). Trabalhos anteriores demonstraram a capacidade de diferenciação entre as artropatias pela análise metabolômica. Meshitsuka et al. (1999) observaram que a comparação dos perfis metabólicos de pacientes com artrite reumatóide e osteoartrite permitiu uma clara distinção entre as duas doenças, com níveis de concentração de lactato e alanina bastante diversos do perfil normal. Madsen et al., (2011) relataram sensibilidade de 90% e especificidade de 94% na diferenciação entre pacientes com artrite reumatóide e artrite psoriásica, havendo diferenças maiores entre os dois grupos de doentes do que entre pessoas com artrite reumatóide e indivíduos hígidos. Muitos estudos foram conduzidos utilizando a urina ou soro, ou a comparação pareada destes na investigação da osteoartrite. No entanto, a análise destes fluidos sofre interferência da idade, alimentação, massa muscular, entre outros fatores que podem confundir o padrão único desta doença. Por esta razão, o líquido sinovial se configura como a amostra mais precisa, específica e de tempo real que se pode obter para o estabelecimento do perfil metabólico (ADAMS et al., 2012).

Acredita-se que a utilização da metabolômica no caso das artrites reumatóides seja de especial interesse na medicina, pelo fato de que esta técnica pode ser utilizada no diagnóstico prematuro, na predição da resposta à terapia e no controle da progressão da doença através dos biomarcadores, uma vez que está comprovado que o diagnóstico e a intervenção terapêutica precoces melhoram consideravelmente o prognóstico (PRIORI et al., 2013). Tal justificativa pode, igualmente, ser aplicada no caso da OCD em equinos, onde a identificação precoce do processo pode orientar a conduta em uma criação animal, seja para a prevenção e tratamento da doença ou mesmo para a triagem de indivíduos isentos de distúrbios potencialmente genéticos.

2.7.2 Aplicações na Medicina Veterinária

Nas ciências veterinárias, esta técnica é ainda pouco explorada, sendo que a maioria das pesquisas é direcionada às artropatias no modelo experimental canino (DAMYANOVICH et al., 1999b; CROVACE et al., 2006). Em experimento conduzido em cães apresentando osteoartrite induzida pela transecção do ligamento cruzado anterior, observaram-se significativas diferenças nos espectros dos animais doentes quando comparados aos controles normais. As maiores alterações no espectro dos animais doentes foram o acentuado aumento dos picos referentes ao lactato e a grande queda nos níveis de glicose do líquido sinovial. Somado a estes picos, observaram, ainda, diferenças nos níveis de piruvato, leucina, glicerol, alanina, isoleucina, corpos cetônicos e ácidos graxos associados a lipoproteínas, caracterizando o ambiente articular como hipóxico e acidótico, com alteração das vias metabólicas de lipídios (DAMYANOVICH et al., 1999a).

Na medicina veterinária de equinos, Ralston et al., (2009) investigaram o perfil bioquímico do soro de potros Standardbred. Neste estudo foram feitas avaliações pareadas comparando potros filhos de um mesmo garanhão, com e sem OCD da articulação tibiotársica. Os resultados obtidos revelaram a clara separação entre os grupos doentes e hígidos através de métodos estatísticos de Análise da Componente Principal (PCA). Além disso, foram observados aumentos significativos nos níveis de colina, tirosina, treonina, lisil albumina e ß-glicose, bem como menores concentrações de aminoácidos, α-glicose e lipoproteínas de baixa densidade nos animais com OCD.

Laticignola et al. (2008) conduziram um estudo comparando o perfil metabólico do líquido sinovial de cavalos hígidos com o de animais apresentando osteoartrite. Neste estudo, os sinais dos metabólitos selecionados como marcadores inflamatórios foram o lactato, alanina, acetato, N-acetilglucosamina, piruvato, citrato, creatina/creatinina, glicerol, colina e α-glicose. Comprovou-se que a análise espectral deste fluido revela diferenças significativas entre os grupos mencionados, sugerindo tratar-se de técnica de grande utilidade diagnóstica e como auxiliar no estabelecimento de novas terapias.

Concluindo, a análise metabolômica tem sido aplicada em diversas enfermidades e o que se observa é o seu grande potencial na ampliação do conhecimento do mecanismo das doenças e da possibilidade de realização de um diagnóstico precoce e monitoramento do tratamento empregado (PRIORI et al., 2013). Esta técnica pode ser extremamente útil no estudo do metabolismo articular e deve possibilitar a avaliação da atividade terapêutica de drogas anti-inflamatórias a nível molecular (LACITIGNOLA et al., 2008).

Como demonstrado, a grande maioria dos estudos está voltada para alterações inflamatórias, porém, acredita-se que esta técnica seja igualmente importante na avaliação da OCD. Acreditamos que a análise por ^{1}H RMN seja imensamente útil da detecção de alterações metabólicas na fase inicial da doença, quando o processo inflamatório e de degradação ainda não tiveram início, porém já existe distúrbio metabólico. Pelo fato desta doença ser, em geral, detectada tardiamente em seu curso de evolução no paciente, as alterações no metabolismo detectadas atualmente pelos biomarcadores tratam-se, provavelmente, de processos secundários à doença (YTREHUS et al., 2007). Este fato salienta a importância do estabelecimento de ferramentas para o diagnóstico durante os estágios iniciais e, geralmente, assintomáticos da OCD. A análise metabolômica oferece uma janela precoce para detecção de alterações no perfil bioquímico do início e progressão da doença, podendo ainda direcionar a prevenção e a instituição de potenciais tratamentos (ADAMS et al., 2012).

Até o presente momento não há relatos de análises do metabolismo articular por espectroscopia de ^{1}H RMN para o estabelecimento do perfil metabólico do líquido sinovial de equinos apresentando osteocondrite dissecante.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Estabelecer o perfil metabólico global do líquido sinovial de equinos hígidos e equinos acometidos por osteocondrite dissecante (OCD).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a aplicabilidade de método alternativo, minimamente invasivo e não destrutivo das amostras, para a caracterização e diagnóstico da osteocondrite dissecante em equinos através do líquido sinovial.

- Utilizar o perfil metabólico global para identificar uma característica metabólica distinta do líquido sinovial proveniente de equinos acometidos por osteocondrite dissecante, comparado àquele proveniente de animais sem doenças articulares.

- Avaliar a possibilidade de distinção entre os líquidos sinoviais de articulações com OCD sintomática e assintomática através da avaliação do metabolismo articular.

4 JUSTIFICATIVA

O presente projeto tem sua importância na busca da melhor compreensão das alterações metabólicas presentes nas articulações de animais acometidos por osteocondrite dissecante e suas consequências no líquido sinovial através de método inovador, pouco invasivo e de fácil utilização. Espera-se com esta pesquisa, estabelecer o perfil metabólico global do líquido sinovial de equinos hígidos e acometidos por osteocondrite dissecante, bem como comparar o perfil do metabolismo nestas duas condições, a fim de que se estabeleça no futuro como uma ferramenta adjuvante no monitoramento desta enfermidade articular e forneça um padrão de reconhecimento da progressão da doença frente ao tratamento.

5 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado nos Serviços e Laboratórios de Pesquisa dos Departamentos de Clínica Médica (VCM) e de Cirurgia (VCI) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), assim como no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/UNICAMP), onde foram realizadas a aquisição e avaliação dos dados.

Todos os equinos foram utilizados com o consentimento do proprietário e seguindo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais em pesquisa da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ – USP (Projeto N° 3155/2013)

5.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

5.1.1 Articulações Hígidas

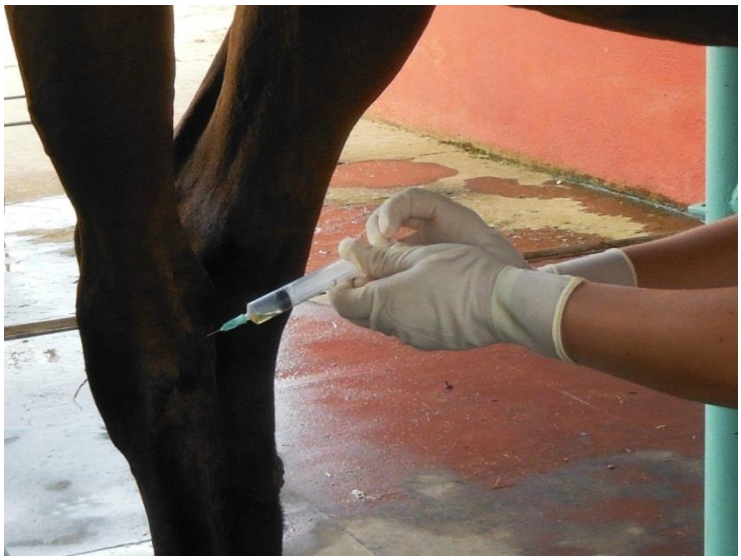
5.1.1.1 Critérios de Inclusão

Foram utilizados os líquidos sinoviais provenientes das articulações hígidas de equinos, com idades entre cinco e 10 anos, de diferentes raças, pesando entre 350 e 500 kg, mantidos em piquetes de propriedade particular (Fazenda Santa Rita II) situada no município de Bragança Paulista. Os animais recebiam como alimento ração balanceada na quantidade equivalente a 1% do peso vivo, água *ad libitum* e volumoso também à vontade, em piquetes de gramínea Tyfton. Além destes, foram colhidos líquidos sinoviais das articulações de animais de pesquisa pertencentes aos Departamentos de Cirurgia e de Clínica Médica da FMVZ – USP, os quais recebiam a mesma alimentação mencionada anteriormente. Para este estudo, foram colhidas amostras de líquido sinovial provenientes de 40 articulações tibiotársicas de equinos que não apresentassem histórico de lesões, que não demonstrassem claudicação ao exame físico, e que não fossem responsivos ao teste de flexão dos membros pélvicos.

5.1.1.2 Colheita do Líquido Sinovial

Para os animais incluídos neste grupo, foram colhidas amostras de 2 a 6 ml de líquido sinovial das articulações tibiotársicas. O acesso escolhido para a artrocentese localizava-se medialmente à veia safena, logo abaixo do maléolo medial da tíbia, na face dorsomedial do tarso, segundo Moyer (1986), e foi realizado utilizando-se agulhas hipodérmicas 30 x 8 mm. O animal foi posicionado no tronco de contenção e recebeu sedação com Detomidina 0,01 mg/kg. O local de punção das articulações tibiotársicas foi tricotomizado e preparado assepticamente antes de cada colheita, com o uso de iodopovidona e álcool 70% (Figura 11).

Figura 11 – Colheita do líquido sinovial da articulação hígida de equino.



Fonte: FMVZ-USP

5.1.2 Articulações apresentando Osteocondrite Dissecante

5.1.2.1 Critérios de Inclusão

Foram utilizados os líquidos sinoviais provenientes das articulações de equinos com idade acima de três anos, de diferentes raças e pesos. Neste estudo, foram incluídas 53 articulações tibiotársicas de equinos atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/USP com diagnóstico clínico de OCD, confirmado aos exames ultrassonográfico e radiográfico (Figura 12), sendo 12 referentes a articulações com OCD assintomática e 41 com OCD sintomática.

Figura 12 - Imagens radiográfica e ultrassonográfica de lesão de OCD em articulação tibiotársicas de equino.

Fonte: FMVZ-USP

Legenda: As setas indicam a presença de fragmento osteocondral destacado.

Durante a permanência no Hospital Veterinário os animais foram mantidos em baias sob condições naturais de luz, temperatura e umidade. Receberam como alimento ração balanceada, suplementada com feno de gramínea *coast cross* (*Cynodum dactylum*) e água fornecida *ad libitum*. Para os animais apresentando OCD bilateral, de ambos os membros foram colhidos líquidos sinoviais, perfazendo duas amostras por individuo. No caso de OCD unilateral, de ambos os membros foram colhidos líquidos sinoviais, também perfazendo duas amostras por individuo, sendo uma com OCD e outra utilizada como controle hígido.

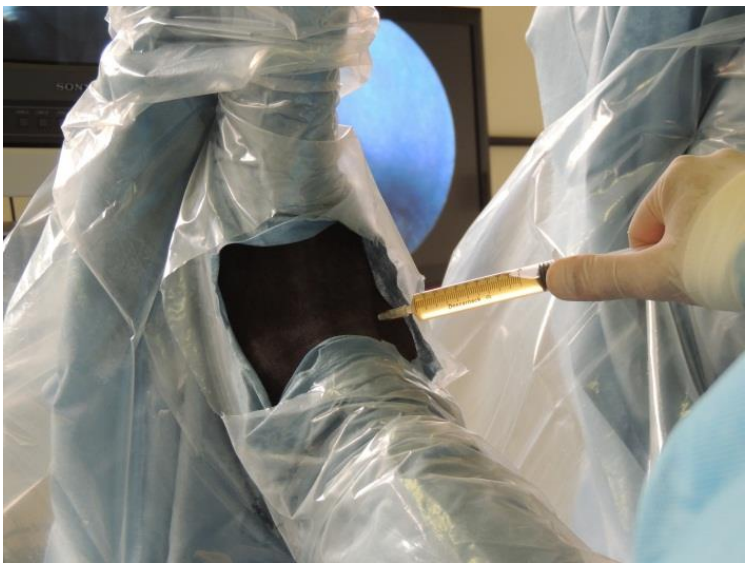
5.1.2.2 Colheita do Líquido Sinovial

Para as articulações apresentando OCD, a colheita de líquido sinovial ocorreu durante o procedimento artroscópico preconizado como parte do tratamento. As artroscopias foram realizadas no Serviço de Cirurgia de Grandes Animais da FMVZ-USP.

Os animais permaneceram em jejum alimentar de 12 horas antes do procedimento cirúrgico. Uma ampla área na articulação tibiotársica acometida foi preparada de maneira rotineira para artroscopia. Antecedendo o procedimento anestésico foi administrada amicacina na dose de 15 mg/Kg e fenilbutazona na dose de 4,4 mg/Kg, ambas por via intravenosa. A sedação foi realizada com cloridrato de xilazina 10% (0,6 mg/kg), administrada pela via intravenosa 15 minutos antes da indução anestésica. Para a indução da anestesia foi utilizado diazepam (0,05mg/kg) associado à quetamina 10% (2,2 mg/kg), seguido de éter-gliceril-

guaiacol (EGG) 10% (100 mg/kg), ambos pela via intravenosa, possibilitando assim a intubação orotraqueal. Para a manutenção anestésica foi utilizado isofluorano vaporizado em oxigênio 100%. O animal foi posicionado em decúbito dorsal e as articulações foram submetidas à antissepsia e colocação de campos operatórios. A artrocentese foi realizada sobre a bolsa dorsomedial, com agulha 40x10, permitindo a colheita de líquido sinovial e infusão de solução de ringer lactato para distensão articular (Figura 13). O procedimento artroscópico subsequente ocorreu visando o tratamento específico do quadro de OCD. O pós-operatório consistiu em antibioticoprofilaxia sistêmica com amicacina na dose de 15 mg/Kg, por via intravenosa, a cada 24 horas, totalizando três aplicações. Como agente anti-inflamatório foi utilizada a fenilbutazona (4,4 mg/kg), por via intravenosa, uma vez ao dia, durante três dias. As feridas foram mantidas com penso protetor e os curativos realizados a cada troca com solução fisiológica, até a retirada dos pontos de sutura, que se deu no 10º dia do pós-operatório.

Figura 13 - Colheita do líquido sinovial de articulação apresentando OCD, de equino submetido à artroscopia.



Fonte: FMVZ-USP

Parte do material utilizado no grupo com OCD era proveniente de projeto de pesquisa já realizado, armazenado para este fim em freezer -80°C (Protocolo CEUA No 1238/2008). Os líquidos sinoviais congelados foram submetidos a testes prévios para validação do método de ^{1}H RMN, visando certificar que as amostras congeladas apresentassem os mesmos padrões das demais.

5.2 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL - ^{1}H RMN

5.2.1 Processamento das Amostras de LS

As amostras colhidas em ambos os grupos foram imediatamente submetidas à centrifugação a 2000rpm, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, transferido para um tubo de Eppendorf e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. O pellet celular foi preservado para ser utilizado em pesquisas envolvendo o cultivo de sinoviócitos.

Os tubos Eppendorf contendo líquido sinovial foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados a temperatura ambiente, sendo novamente submetidos à centrifugação a 2000rpm, 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação, 0,5ml da amostra foi pipetado e acondicionado em tubos de RMN contendo 50µL de água deuterada, utilizada para o *lock* no equipamento de RMN (Figura 14). A água deuterada age como solvente para promover a estabilização da aquisição dos dados. O instrumento "trava" na ressonância do deutério, a qual não será observada, atingindo uma estabilidade da frequência do campo. Isto é necessário, pois o campo magnético sofre pequenos desvios ao longo do tempo, o que em longo prazo produziria sinais espectroscopicamente amplos e descaracterizados.

Após a adição da água deuterada, procedeu-se com a homogeneização por inversão total, tomando-se o cuidado de não formar bolhas no interior dos tubos.

Figura 14 - Preparação das amostras para realização da análise metabolômica.

Fonte: IQ-UNICAMP

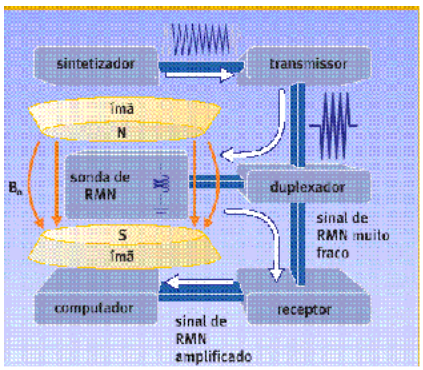
Legenda: Após centrifugação, o líquido sinovial foi colocado em tubos de RMN contendo água deuterada.

5.2.2 Aquisição dos Espectros de ^{1}H RMN

Os espectros de ^{1}H RMN foram adquiridos no espectrômetro Bruker Avance III operando a 500.0 MHz para ^{1}H. As amostras foram mensuradas a temperatura ambiente (25°C), utilizando a sequência de pulsos de Carr Purcell Meiboom Gill (CPMG) com pré-saturação do sinal da H_2O. A aquisição foi realizada adquirindo-se 32768 pontos (32K), com tempo de aquisição de 1,6s (SW=20.61ppm). O sinal remanescente da água foi suprimido com pré-saturação em onda contínua (CW) durante 1.2s, e 160 varreduras foram utilizadas para se obter uma boa relação sinal-ruído.

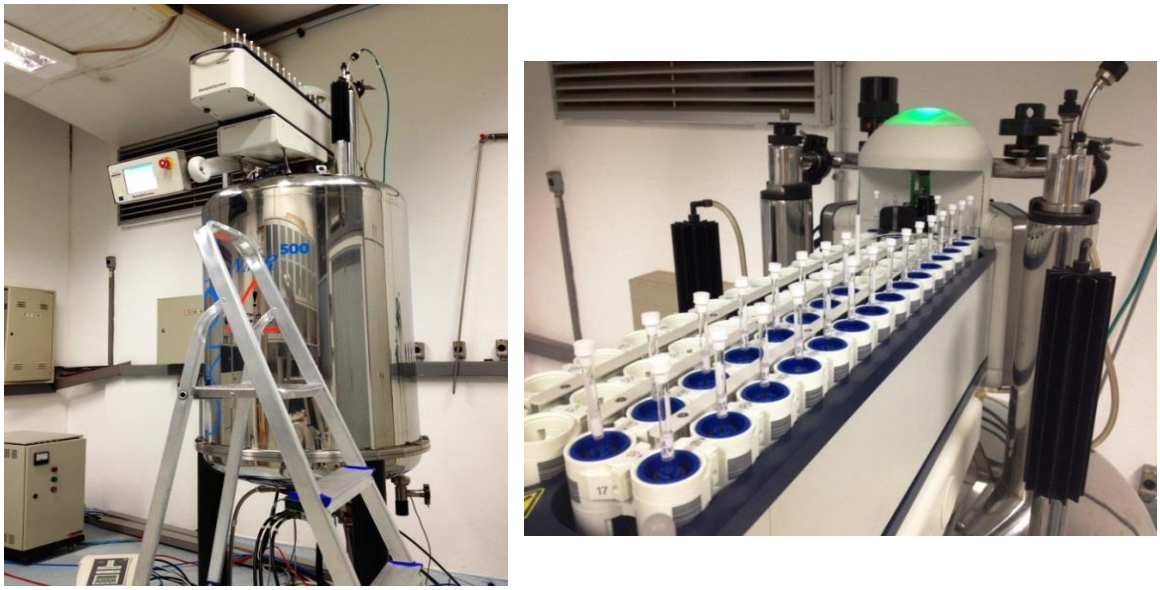
A sequência de CPMG ou filtro de t_2 faz com que, após a transferência de magnetização para o plano xy, pela aplicação inicial de um pulso de 90º na direção x esta seja mantida neste plano através da aplicação de sucessivos pulsos de 180º na direção y. Nesta etapa, um curto período de tempo é permitido entre os pulsos de 180º o qual é ajustado para permitir que ocorra a relaxação transversal de moléculas com t_2 curto. Desta forma os sinais referentes às macromoléculas não são observados devido a perda de coerência dos vetores magnetização destas no plano xy, eliminando os sinais alargados destas moléculas nos espectros (PURCELL et al., 1946).

Figura 15. Ilustração do interior do aparelho de ^{1}H RMN.



Fonte:http://www.ced.ufsc.br/men5185/trabalhos/03_computacao_quantica/nova_pagina_11.htm

Figura 16 - Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III 500.0 MHz do Instituto de Química da UNICAMP.



Fonte: IQ-UNICAMP
Legenda: No detalhe, a bandeja rotatória para posicionamento das amostras, que são levadas ao interior do aparelho para aquisição dos dados.

5.2.3 Processamento dos Dados de Espectroscopia

Os espectros adquiridos foram processados utilizando-se a função de apodização exponencial (Linha de Base = 1Hz) para a diminuição do ruído, o qual encobre o sinal de picos menores no espectro. A correção de fase foi realizada manualmente de forma que as regiões de interesse ficassem em fase, ignorando-se para esta correção a fase final do sinal residual da H_2O, sendo possível estabelecer a relação entre os espectros de diferentes animais. A linha de base total foi realizada através de uma função linear. Os deslocamentos químicos dos picos foram referenciados à posição do pico do lactato em 1.3 ppm.

5.2.4 Avaliação dos Resultados

O intervalo do espectro considerado para análise foi de 0 a 9 ppm, por ser a região que apresentando sinais de ressonância. Os dados espectroscópicos foram primeiramente digitalizados e então arranjados em matrizes de dados para serem avaliadas por técnicas estatísticas multivariadas.

Após a obtenção dos dados, os picos foram atribuídos aos seus respectivos metabólitos através do Software ChenomX NMR Suite 7.6 Profiler® (ChenomX Inc.), dos bancos de

dados disponíveis online (Madison Metabolomics Consortium Database, Biological Magnetic Resonance Bank e Human Metabolome Database) e com base na literatura já estabelecida para os fluidos biológicos.

As análises qualitativas foram limitadas aos componentes mais facilmente detectáveis por sua alta concentração ou devido à sua ressonância ocorrer em áreas do espectro que estivessem livres de outros sinais. O pico da alanina em 1.5 ppm foi utilizado como padrão de referência interna, padronizando a intensidade dos espectros.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O método estatístico de eleição para este tipo de dado é a Análise de Componente Principal (Principal Component Analysis - PCA). Esta avaliação consistiu na determinação de novo sistema coordenado através do estudo da correlação entre as matrizes. A análise de componentes principais (PCA) é um método não supervisionado de análise exploratória, ou seja, que não faz uso de informações prévias sobre as distribuições das amostras e, que possibilita a detecção dos padrões essenciais no conjunto de dados.

Uma componente principal é definida por um par de pesos e escores, sendo os pesos responsáveis pela descrição das relações entre as variáveis e os escores pela descrição das relações entre as amostras, em cada componente principal. Portanto, similaridades e diferenças entre amostras ou variáveis podem ser vistas através de gráficos de escores ou pesos, respectivamente, de uma componente principal *versus* outra.

As componentes principais são obtidas de modo a descrever a máxima variância nos dados e são calculadas em ordem decrescente de importância. Em outras palavras, a primeira componente principal sempre descreve maior variância do que a segunda componente, que por sua vez descreve maior variância que a terceira e assim sucessivamente.

Desta forma, a PCA fundamenta-se na correlação entre as variáveis e assim reduz a dimensionalidade dos dados permitindo que determinadas informações fiquem mais evidentes (WOLD et al, 1987).

Além da Análise da Componente Principal, avaliamos os espectros por comparação visual e pela comparação da intensidade dos picos dos metabólitos de interesse.

6 RESULTADOS

Como resultados apresentamos o perfil metabólico das amostras, a identificação dos metabólitos responsáveis pela diferenciação entre os grupos e as alterações nas intensidades destes.

Os líquidos sinoviais utilizados no grupo com OCD, congelados em freezer -80°C e provenientes de projeto de pesquisa anterior (Protocolo CEUA No 1238/2008), foram submetidos a testes para validação do método de ^{1}H RMN, visando certificar que as amostras apresentassem os mesmos padrões das amostras recém-colhidas, o que foi confirmado, uma vez que exibiam espectros equiparáveis, sendo possível sua utilização sem prejuízo à pesquisa.

6.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO

A análise metabolômica possibilitou a identificação do perfil metabólico dos diferentes grupos. A comparação dos espectros obtidos demonstrou que as três condições articulares apresentam espectros com 32 metabólitos em comum, os quais estão listados na Tabela 1. Destes, 11 apresentam pico mais acentuado para as amostras com OCD quando comparados com as amostras de articulações hígidas, que serão apresentados posteriormente. Além destes, foram identificados dois metabólitos presentes, exclusivamente, nos espectros de articulações com OCD sintomática e assintomática, estando ausentes nas articulações hígidas, como consta na Tabela 2. Os valores de deslocamento químico se referem à escala de frequência do espectro onde ocorrem os picos dos metabólitos.

Tabela 1 - Metabólitos e seus respectivos deslocamentos químicos comuns ao líquido sinovial de articulações hígidas e com OCD sintomática e assintomática

(continua)

METABÓLITO	DESLOCAMENTO QUÍMICO (ppm)
3-hidroxibutirato	1.2, 2.3, 2.4, 4.1
3- hidroxiisobutirato	1.1, 2.5, 3.5, 3.7
Alanina	1.5, 3.8
Acetato	1.9 ppm

(conclusão)

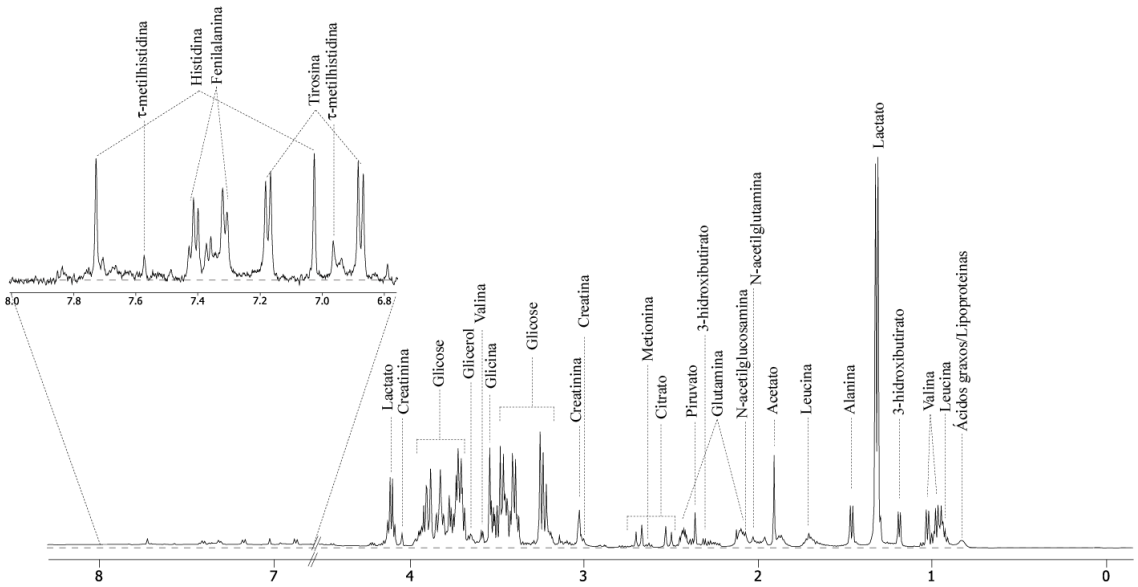
METABÓLITO	DESLOCAMENTO QUÍMICO (ppm)
Acetoacetato	2.3, 3.4
Acetona	2.2
Citrato	2.5, 2.7
Creatina	3.0, 3.9
Creatinina	3.0, 4.0
Colina	3.2, 3.5, 4.1
Etanol	1.2, 3.6
Fenilalanina	3.1, 3.3, 4.0, 7,3, 7.4, 7.4
Glicerol	3.5, 3.6, 3.8
Formato	8.4
Glicose	3.2, 3.4, 3.5, 3.7, 3.8, 3.9, 4.6, 5.2
Glicuronato	3.3, 3.5, 3.6, 3.7, 4.1, 4.6, 5.2
Glutamina	2.1, 2.4, 2.5, 3,7, 6.9, 7.6
Histidina	3.1, 3.2, 4.0, 7.0, 7.7
Isoleucina	0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0, 3.7
Lactato	1.3, 4.1
Leucina	0.9, 1.0, 1.7, 3.7
Lisina	1.4, 1.5, 1.7, 1.9, 3.0, 3.7
Metionina	2.1, 2.2, 2.6, 3.8
N-acetilglucosamina	2.0, 3.4, 3.5, 3.7, 3.8, 3.9, 4.7, 5.2, 8.1, 8.2
N-acetilglutamina	1.9, 2.0, 2.1, 2.3, 2.3, 4.2, 6.8, 7.5, 7.9
Dimetil sulfona	3.1
Prolina	2.0, 2.1, 2.3, 3.3, 3.4, 4.1
τ -metil histidina	3.0, 3.1, 3.7, 3.9, 7.0, 7.6
Tirosina	3.0, 3.2, 3.9, 6.9, 7.2
Treonina	1.3, 3.5, 4.2
Uréia	5.8
Valina	1.0, 2.3, 3.6

Tabela 2 - Metabólitos e seus respectivos deslocamentos químicos presentes, exclusivamente, no líquido sinovial de articulações com OCD sintomática ou assintomática

METABÓLITO	DESLOCAMENTO QUÍMICO (ppm)
Propilenoglicol	1.1, 3.4, 3.5, 3.9
Composto aromático	7.0 a 7.1

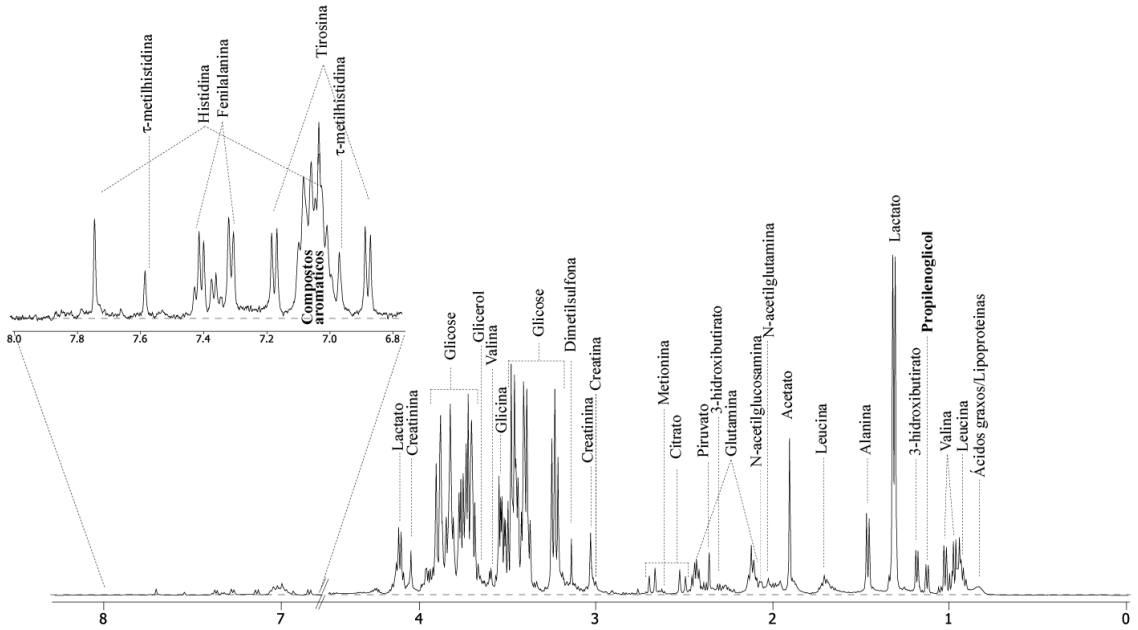
As identificações dos metabólitos em suas regiões específicas nos espectros de uma articulação hígida e uma com OCD sintomática estão demonstradas a seguir (Figuras 17 e 18). Utilizou-se o lactato como referência interna para normalização dos dados. As diferenças entre os perfis são facilmente identificáveis por comparação visual, sendo que o destaque está na presença de propilenoglicol em 1.15 ppm e de composto aromático em, aproximadamente, 7.0 ppm.

Figura 17 - Espectro geral de articulação hígida, com a identificação dos metabólitos presentes no líquido sinovial



Legenda: Os metabólitos estão identificados de acordo com seu deslocamento químico. Para efeito de melhor visualização a frequência referente à água, na região de 4.5 a 6.0 ppm foi excluída. O pequeno espectro superior corresponde à magnificação da região aromática de 6.8 a 8.0.

Figura 18 - Espectro geral de articulação com OCD sintomática, com a identificação dos metabólitos presentes no líquido sinovial.



Legenda: Os metabólitos estão identificados de acordo com seu deslocamento químico. Para efeito de melhor visualização a frequência referente à água, na região de 4.5 a 6.0 ppm foi excluída. O pequeno espectro superior corresponde à magnificação da região aromática de 6.8 a 8.0 ppm. Observar o destaque para os compostos em negrito (propilenoglicol e compostos aromáticos), os quais não estão presentes na figura acima.

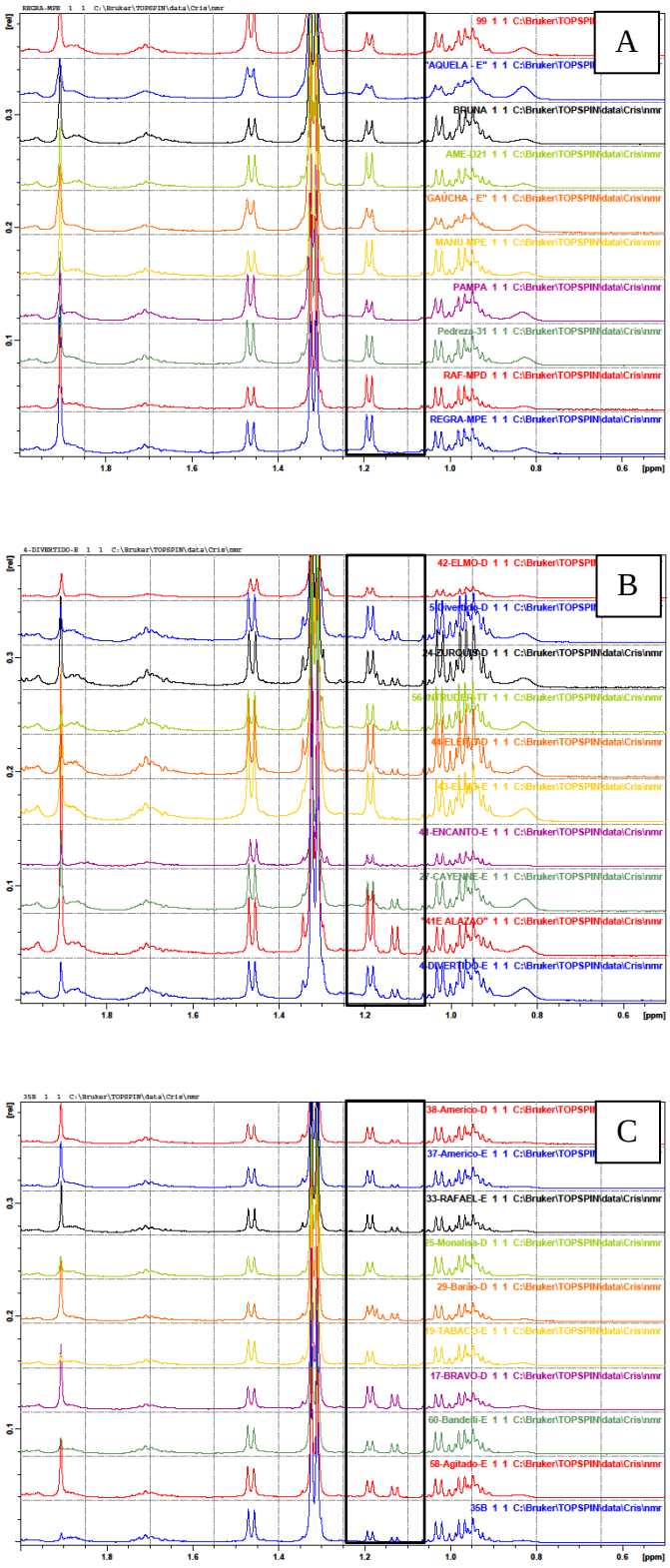
6.2 COMPARAÇÃO DOS METABÓLITOS DIFERENCIAIS ENTRE OS GRUPOS

A título de comparação, foram agrupados 10 espectros característicos de articulações hígidas, OCD assintomática e OCD sintomática. Estes espectros foram colocados juntamente dentro de um mesmo grupo, com a região de interesse destacada.

Na figura 19, apresenta-se os espectros da região alifática de 0.5 a 2.0 ppm das articulações (A) hígidas, (B) com OCD assintomática e (C) com OCD sintomática. O metabólito presente na região 1.15 ppm, marcada com retângulo no gráfico, correspondente ao propilenoglicol, está ausente no primeiro grupo, aparecendo em diferentes intensidades na maioria dos espectros das articulações com OCD sintomática e assintomática.

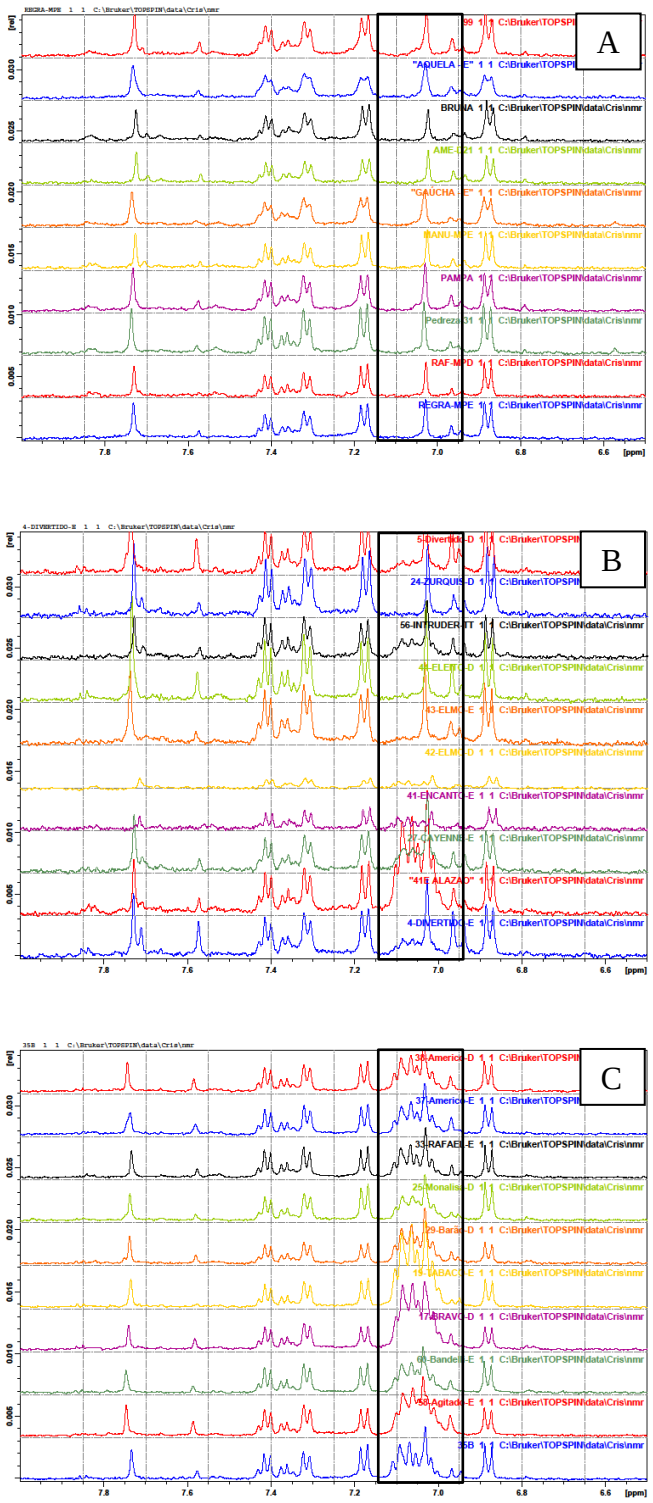
Na figura 20, apresenta-se os espectros da região aromática 6.65 a 8.0 ppm das articulações (A) hígidas, (B) com OCD assintomática e (C) com OCD sintomática. O metabólito presente na região de 7.0 a 7.1 ppm, marcada com retângulo no gráfico, correspondente ao composto aromático, está ausente no grupo hígido, aparecendo em menor intensidade nos espectros das articulações com OCD assintomática e em maior intensidade em todos os espectros das articulações com OCD sintomática.

Figura 19 - Espectros referentes à região alifática de 0.6 a 2.0 ppm de dez amostras de líquido sinovial de articulações (A) hígidas, (B) com OCD assintomática e (C) com OCD sintomática.



Legenda: O retângulo evidencia a região de interesse contendo a ressonância do propilenoglicol em 1.15ppm

Figura 20 - Espectros referentes à região aromática de 6.5 - 8.0 ppm de dez amostras de líquido sinovial de articulações (A) hígidas, (B) com OCD assintomática e (C) com OCD sintomática.



Legenda: O retângulo evidencia a região de interesse contendo o composto aromático em 7.0 a 7.15 ppm

6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Levando-se em consideração a variabilidade biológica entre os animais, a análise estatística de todos os espectros se faz necessária para que se identifiquem os metabólitos estatisticamente significativos, responsáveis pela discriminação entre os grupos. Com este intuito, foram realizados dois tipos de avaliação: a análise de intensidade dos espectros e a análise estatística de PCA, as quais serão demonstradas a seguir.

O conjunto de dados explorado possuía inicialmente 96 espectros de RMN de hidrogênio, alguns deles com desvios bastante pronunciados nas suas linhas de base. Por esta razão, alguns dos espectros foram removidos do conjunto de dados, resultando em 74 espectros finais (referentes a 33 amostras do grupo controle, nove do grupo assintomático e 32 do grupo sintomático).

As regiões de interesse nesta análise quimiométrica foram aquelas que demonstraram uma variação visível entre os três grupos de animais, sendo selecionadas as frequências nos espectros correspondentes a 6.8 a 7.8 ppm para a PCA e de 0.8 a 8.0 ppm para a análise de intensidades. As regiões dos espectros que não demonstraram variações entre os grupos não foram apresentadas.

6.3.1 Análise da intensidade dos espectros

A primeira avaliação quimiométrica consistiu na análise da intensidade dos picos de metabólitos. Para estas regiões, a PCA não forneceu uma clara divisão entre os grupos, optando-se, portanto, por este tipo de análise comparativa. As figuras 21 a 35 consistem na sobreposição de 72 espectros de ^{1}H RMN nas diferentes regiões do espectro. Para estas figuras as linhas em preto correspondem às articulações hígidas, as em vermelho às articulações com OCD assintomática, e as em azul às articulações com OCD sintomática.

De maneira geral, por comparação visual, grande parte dos picos dos metabólitos apresenta um aumento nos espectros das articulações com OCD sintomática e assintomática quando comparados ao grupo hígido. Porém, observa-se, em particular, um aumento dos picos referentes à **glicose, glutamina, etanol, leucina, isoleucina, dimetil sulfona, creatina, creatinina, N-acetilglucosamina e N-acetilglutamina e τ-metil histidina**, além dos picos já mencionados referentes ao **propilenoglicol e composto aromático**. Além destes, observou-se redução dos compostos **acetato e 3-hidroxibutirato** e mesma intensidade de sinal para o

piruvato, citrato, metionina, histidina, tirosina, valina, lactato, alanina, glicina, glicerol e fenilalanina para os grupos de articulações doentes em relação às articulações hígidas.

Na Figura 21 apresenta-se a comparação da intensidade dos espectros na região de 0.86 a 0.96 ppm, correspondente à leucina e isoleucina. É possível observar uma tendência ao aumento de ambos os metabólitos em articulações com OCD assintomática e sintomática quando comparados aos espectros das articulações hígidas.

O metabólito valina demonstrado na região de 0.97 a 1.0 ppm na Figura 22 apresenta-se constante entre as três condições, não apresentando alterações relacionadas à doença em questão.

Na região de ressonância de 1.08 a 1.1 ppm (Figura 23), observa-se a nítida separação entre os grupos para o metabólito correspondente ao propilenoglicol. De acordo com a figura, temos a clara indicação de quais sinais discriminam os grupos de amostras, sendo a região ampliada aquela que mostra essa discriminação de maneira mais evidente. O grupo hígido não apresenta ressonância nesta região e, aparentemente, os sinais menos intensos pertencem às amostras assintomáticas, com o grupo sintomático apresentando os picos de maior intensidade. A ressonância do etanol em 1.12 a 1.14 ppm está presente em um pequeno número de espectros e não apresenta um padrão característico, estando presente em amostras hígidas e com OCD praticamente na mesma intensidade. Os picos referentes ao 3-hidroxibutirato em 1.14 a 1.16 ppm apresentam-se diminuídos para as articulações com OCD assintomática e sintomático com relação as articulações hígidas.

A ressonância referente ao lactato na região de 1.26 a 1.3 ppm, demonstrada na Figura 24, aparentemente não sofre influencia em sua intensidade de acordo com a condição articular. O mesmo comportamento pode ser observado na região de 1.41 a 1.44 ppm dos espectros (Figura 25), região esta que corresponde à alanina, a qual manteve suas intensidades constantes para os três grupos de articulações.

Figura 21 – Comparação da intensidade dos espectros na região de 0.86 a 0.96 ppm, correspondente à leucina e isoleucina

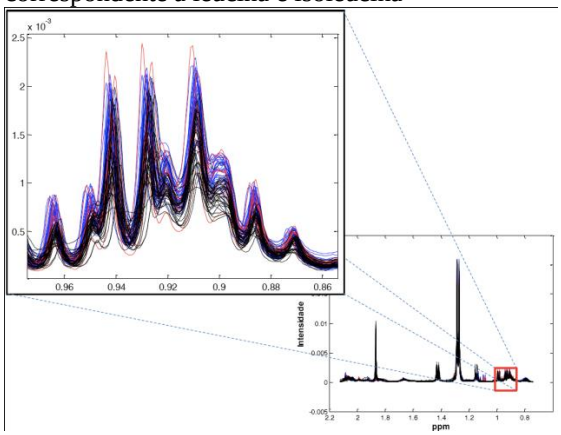


Figura 22 – Comparação da intensidade dos espectros na região de 0.97 a 1.0 ppm, correspondente à valina

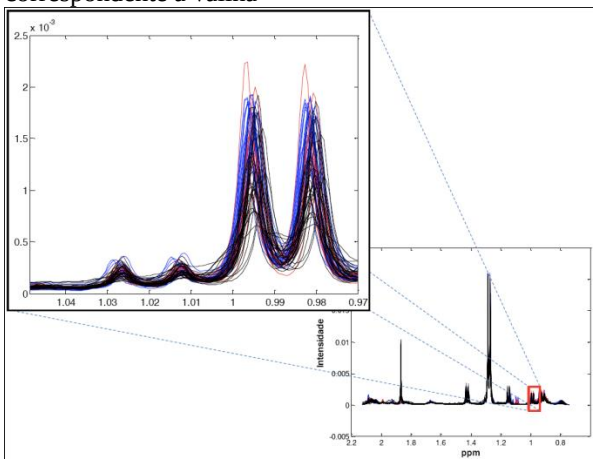
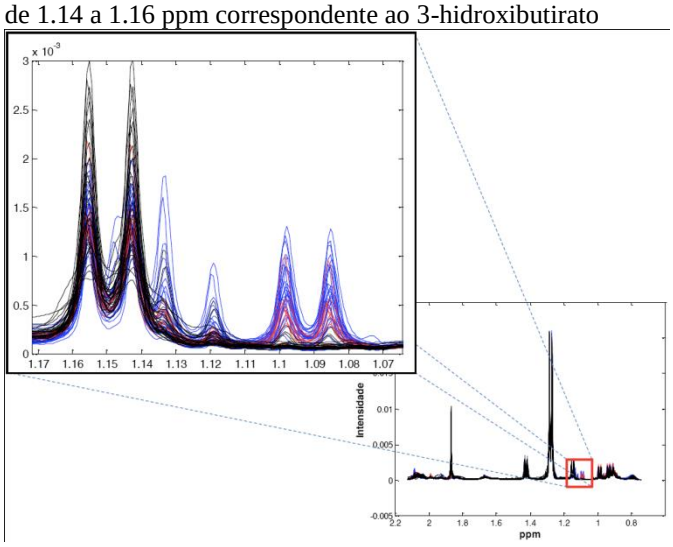


Figura 23 – Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 1.08 a 1.1 ppm correspondente ao propilenoglicol; de 1.12 a 1.14 ppm referente ao etanol e de 1.14 a 1.16 ppm correspondente ao 3-hidroxibutirato



Já a região dos espectros de 1.6 a 1.7 ppm, correspondente à leucina (Figura 26), apresenta uma tendência ao aumento da intensidade dos sinais tanto para as articulações com OCD assintomática quanto para as articulações com OCD sintomática, quando comparadas às articulações hígidas. Observa-se que as ressonâncias do grupo hígido estão sobrepostas em um nível semelhante de intensidade, enquanto o sinal para os grupos doentes estão acima deste nível, com aumento ainda maior das articulações sintomáticas em relação às assintomáticas.

Na comparação dos espectros no pico do acetato na região de 1.86 a 1.88 ppm (Figura 27), observa-se uma diminuição da intensidade deste metabólito para as articulações com OCD assintomática e sintomática, comparativamente ao comportamento dos espectros de articulações hígidas.

Na Figura 28, a comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 1.98 ppm correspondente à N-acetilglutamina demonstrou aumento da mesma ordem para as articulações com OCD sintomática e assintomática em relação as articulações hígidas. Os picos referentes à N-acetilglucosamina na região de 2.02 a 2.04 ppm também apresentaram aumento semelhante para os grupos de articulação com OCD em relação às articulações hígidas. A região de 2.05 a 2.1 ppm da mesma figura, correspondente à glutamina apresentou aumento da intensidade para as articulações com OCD quando comparas às hígidas.

Não foram observadas diferenças entre as articulações estudadas nas intensidades dos metabólitos piruvato em 3.32 ppm, e 3-hidroxibutirato em 2.35 ppm, conforme demonstrado na Figura 29. Já a região de 2.36 a 2.43 ppm, correspondente à glutamina apresentou-se aumentada para as articulações com OCD sintomática e assintomática em relação às articulações hígidas.

Figura 24 – Comparação da intensidade dos espectros na região de 1.26 a 1.3 ppm, correspondente ao lactato

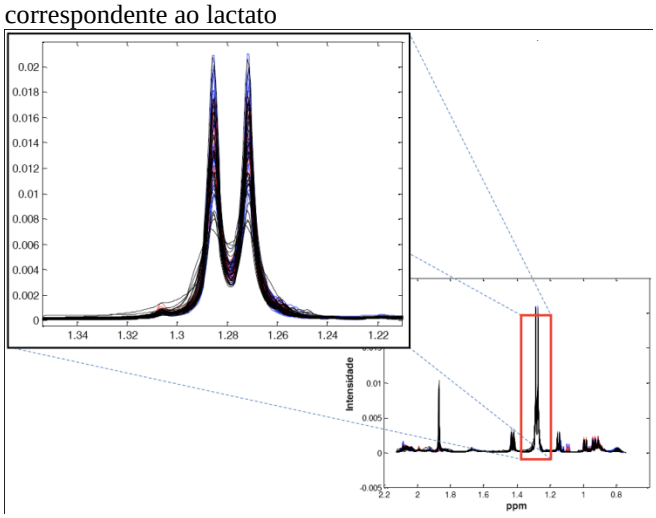


Figura 25 – Comparação da intensidade dos espectros na região de 1.41 a 1.44 ppm, correspondente à alanina

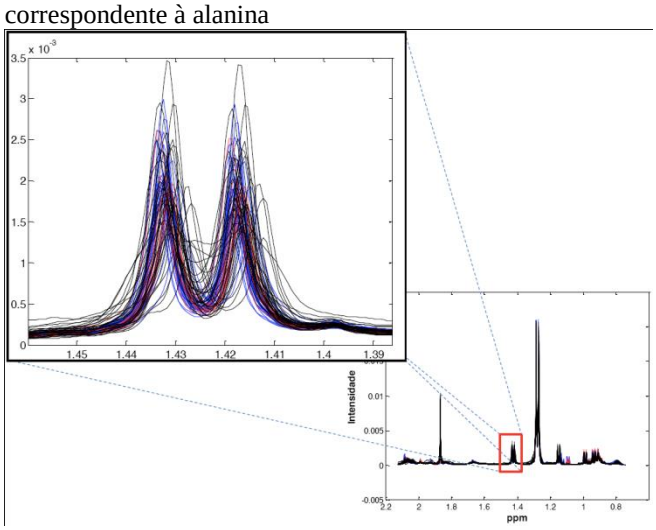


Figura 26 – Comparação da intensidade dos espectros na região de 1.6 a 1.7 ppm, correspondente à leucina

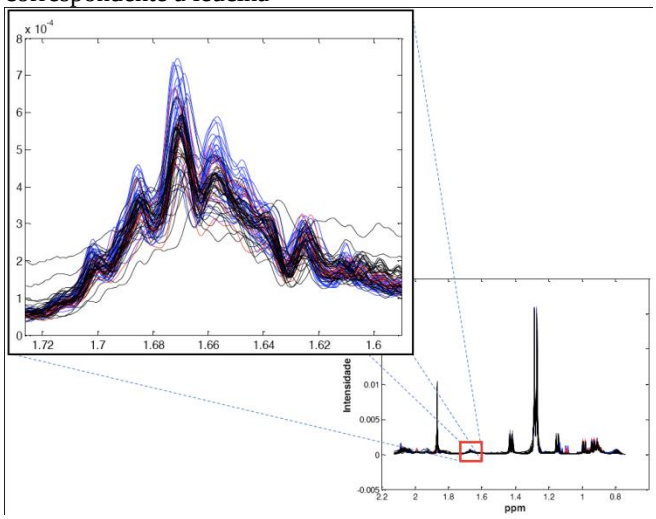


Figura 27 – Comparação da intensidade dos espectros na região de 1.86 a 1.88 ppm, correspondente ao acetato

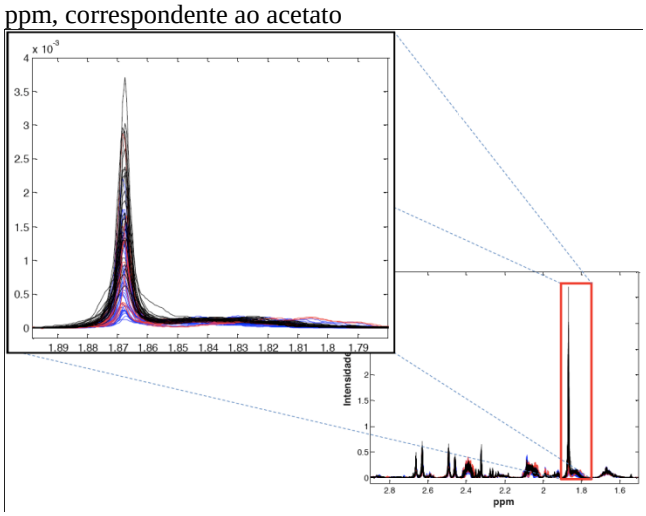


Figura 28 – Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 1.98 ppm correspondente à N-acetilglutamina; de 2.02 a 2.05 ppm referente à N-acetilglucosamina e de 2.05 a 2.1 ppm correspondente à glutamina

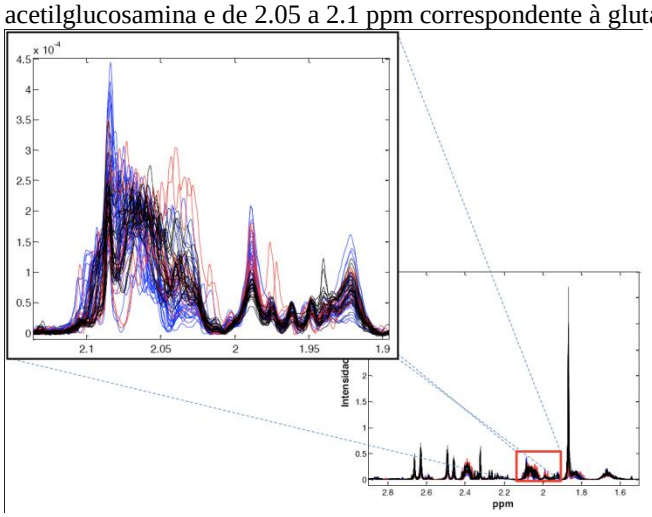
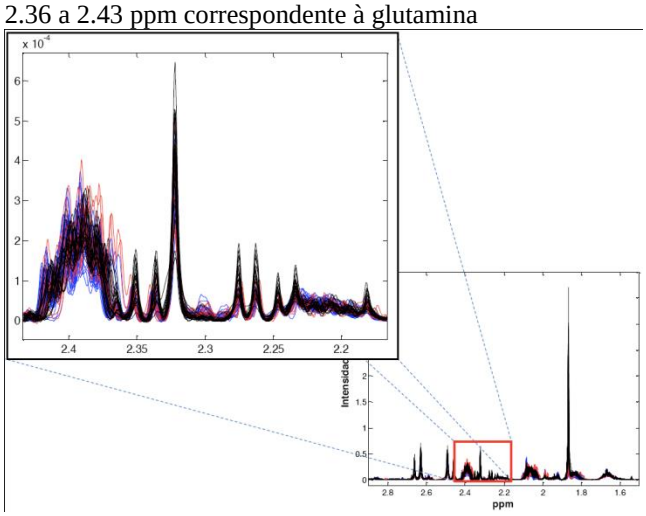


Figura 29 – Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 3.32 ppm correspondente ao piruvato; de 2.35 referente ao 3-hidroxibutirato, e de 2.36 a 2.43 ppm correspondente à glutamina



As intensidades demonstradas nas regiões de 2.45 a 2.5 ppm e de 2.61 a 2.67 ppm correspondente ao citrato; e 2.57 a 2.61 ppm referente à metionina (Figura 30), não demonstraram diferenças entre os grupos de articulações na comparação da intensidade dos espectros.

A comparação da intensidade nas regiões de 3.03 ppm, correspondentes à creatina e creatinina, apresentaram aumento para as articulações doentes em comparação com as hígidas. O pico correspondente à dimetil sulfona em 3.14 ppm apresentou padrão pouco característico, com espectros de amostras dos 3 grupos de articulações, a semelhança do que ocorre com os picos de etanol (Figura 31).

A glicina e o glicerol presentes nas regiões de 3.56 ppm e 3.64 a 3.68 ppm, respectivamente, não apresentaram diferenças na comparação da intensidade dos picos. No entanto, a valina, presente na região de 3.6 ppm apresentou uma tendência ao aumento nas articulações com OCD assintomática e sintomática, com relação as articulações hígidas (Figura 32).

A região de 3.65 a 3.85 ppm referente à glicose demonstrou uma tendência ao aumento de intensidade das amostras de articulações com OCD sintomática em alguns picos. Porém, a mesma tendência não foi verificada no restante da ressonância deste metabólito (Figura 33).

Na figura 34, a tirosina presente em 6.85 e 7.15 ppm, bem como a histidina em 6.98 ppm, não apresentaram diferenças nas intensidades dos espectros entre os três tipos de articulações avaliadas. A **τ** -metil histidina presente em 6.93 ppm apresentou tendência ao aumento em ambos os grupos de OCD. O composto aromático 6.97 a 7.9 ppm apresenta comportamento bastante diverso dos outros metabólitos, estando presente em grande quantidade em articulações com OCD sintomática e em menores intensidades nas articulações assintomáticas, estando ausente em articulações hígidas.

Na comparação dos espectros nas regiões de 7.25 a 7.4 ppm correspondente à fenilalanina, e de 7.7 ppm correspondente à tirosina não foram observadas alterações nas intensidades entre as articulações avaliadas. Já τ-metil histidina, presente em 7.55 ppm apresentou o mesmo comportamento do pico mencionado anteriormente, com tendência ao aumento em ambos os grupos de OCD em comparação às articulações hígidas (Figura 35).

Figura 30 – Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 2.45 a 2.5 ppm e de 2.61 a 2.67 ppm correspondente ao citrato; e 2.57 a 2.61 ppm referente à metionina

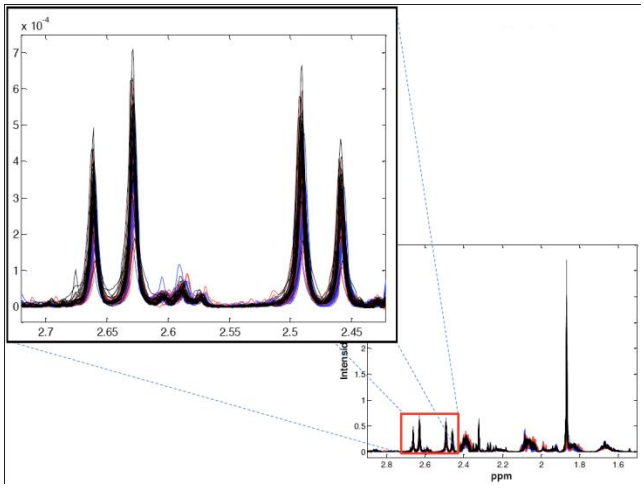


Figura 31 – Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 3.03 ppm correspondente à creatina e creatinina e de 3.14 ppm correspondente à dimetil sulfona

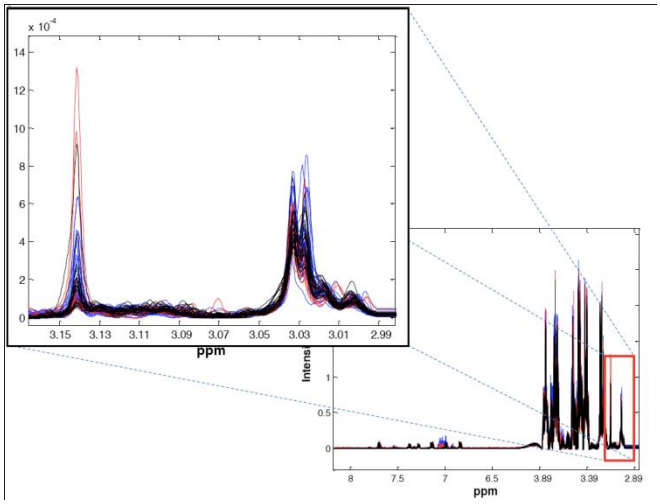


Figura 32 – Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 3.56 ppm correspondente à glicina; de 3.6 ppm referente à valina e de 3.64 a 3.68 ppm correspondente ao glicerol

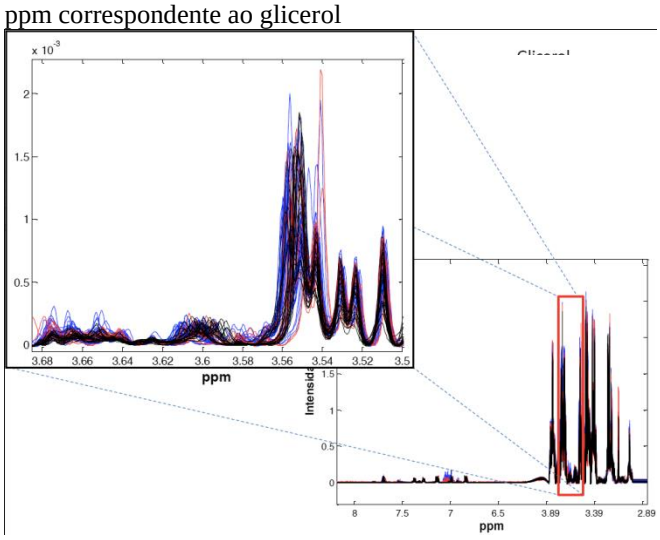


Figura 33 – Comparação da intensidade dos espectros na região de 3.65 a 3.85 ppm correspondente à glicose

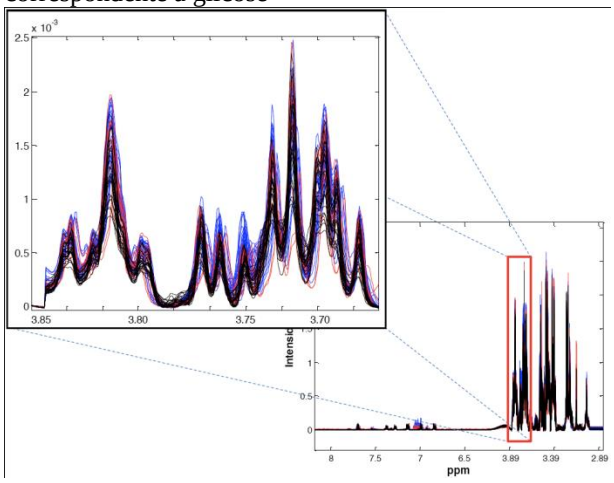


Figura 34 – Comparação da intensidade dos espectros nas regiões 6.85 e 7.15 ppm correspondentes à tirosina; de 6.93 ppm referente à τ -metil histidina; de 6.98 ppm referente à histidina e de 6.97 a 7.9 ppm correspondentes ao composto aromático

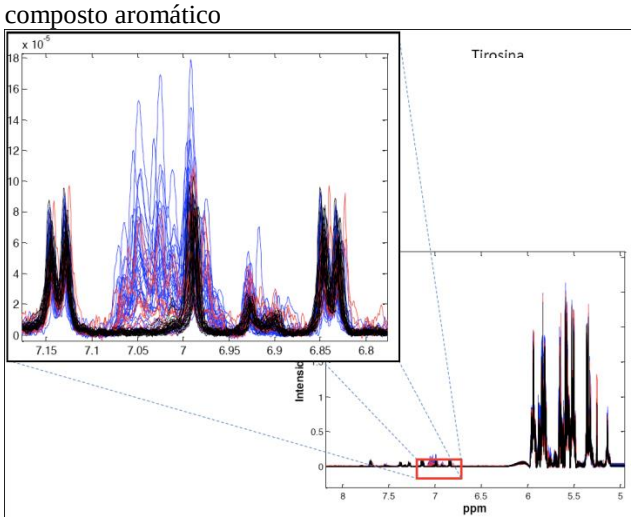
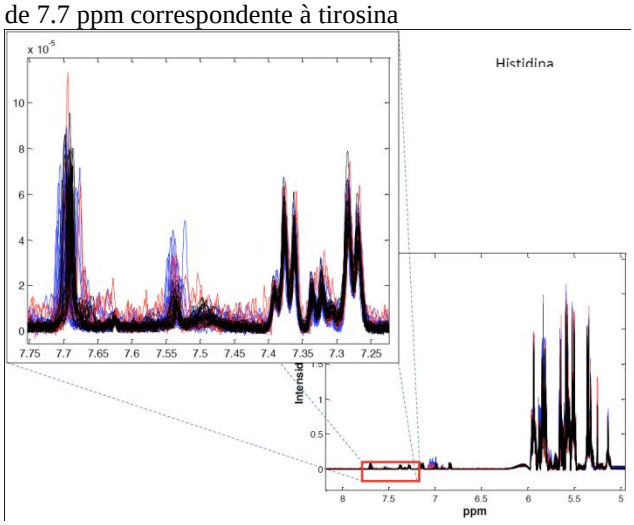


Figura 35 – Comparação da intensidade dos espectros nas regiões de 7.25 a 7.4 ppm correspondente à fenilalanina; de 7.55 ppm referente a τ -metil histidina e de 7.7 ppm correspondente à tirosina



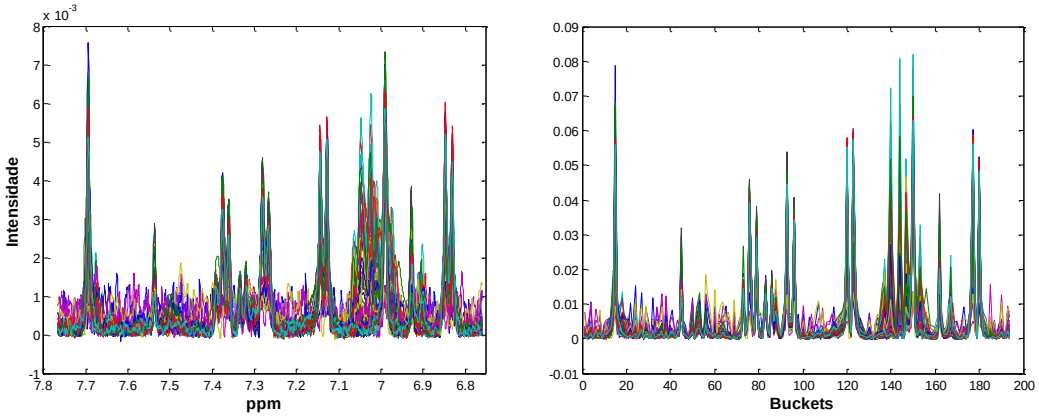
6.3.2 Análise da Componente Principal (PCA) na região de 6.8 a 7.8 ppm

A Análise da Componente Principal foi feita na região que demonstrava a maior diferenciação entre os espectros dos três grupos. A opção por esta pequena região para a realização da PCA foi necessária, pois, apesar de observada a significativa diferença entre os espectros nesta região, a análise estatística do espectro como um todo não permitia a separação entre os grupos. Isto se deve, possivelmente, à interferência de outros espectros maiores, visto que a região apresenta picos de tamanho inferior às demais.

Através deste método matemático foi possível estabelecer grupos distintos de indivíduos, bem como avaliar a variação dos metabólitos com relação aos grupos determinados. Como algumas amostras apresentavam menor volume de líquido sinovial, estas foram diluídas diferentemente, sendo necessário realizar a normalização do conjunto de dados. Ao final, os 74 espectros foram medidos em 1601 variáveis na região.

Os espectros normalizados das 74 amostras estudadas são mostrados na Figura 36 (superior). Para compensar qualquer desvio dos sinais de ^{1}H RMN, ou seja, os seus desalinhamentos, os espectros foram reduzidos em *buckets* de tamanho inicial 0,005 ppm e flexibilidade de 50% (Figura 21, A), utilizando-se a metodologia de *bucketing* otimizado (SOUZA et al, 2013). A seguir foi construído um modelo de análise de componentes principais sobre os dados centrados na média.

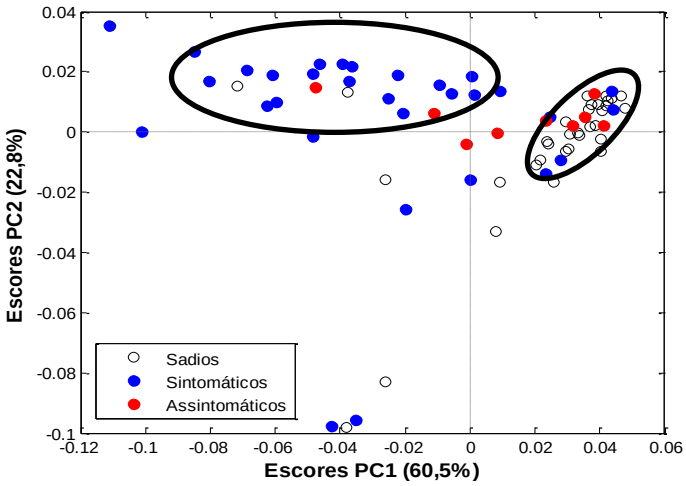
Figura 36 - Espectros de RMN ^{1}H das amostras antes (à direita) e após (à esquerda) a correção dos desalinhamentos utilizando o método de *bucketing* otimizado.



A Figura 37 mostra a PCA para a primeira e a segunda componentes principais. Nesta, observa-se a clara separação entre os grupos controle (elipse à direita), com valores positivos para a PC1 e, o grupo OCD sintomática (elipse à esquerda), com valores tendencialmente

negativos para PC1. O grupo OCD assintomática apresenta-se disperso entre as separações, não apresentando grupamento.

Figura 37 – Gráfico de escores da Análise da Componente Principal das 74 amostras de líquido sinovial de acordo com as componentes 1 (PC1) e 2 (PC2).

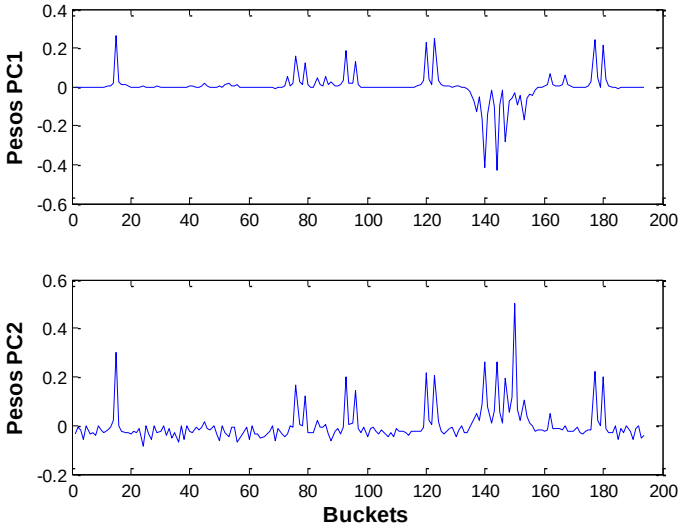


Legenda: As coordenadas abscissa e ordenada correspondem às componentes 1 e 2, respectivamente. As elipses representam a separação entre os grupos.

A Figura 38 mostra os gráficos de pesos da PCA para a primeira e a segunda componente principal. O gráfico de escores (Figura 36) demonstra a tendência nos dados para a diferenciação entre as amostras hígidas, que possuem em sua maioria escores positivos em PC1, e as demais amostras, que se dispersam no sentido dos valores negativos em PC1. Estas últimas amostras se correlacionam com os sinais compreendidos nos *buckets* de 140 a 147, como pode ser visto no gráfico de pesos na Figura 38, tendo estes sinais também valores negativos em PC1. Os *buckets* citados correspondem à região do espectro entre 7,05 e 7,00 ppm (vide apêndice A). Assim, pode ser inferido que as amostras relativas a sujeitos doentes apresentam um aumento na intensidade dos sinais de ^{1}H RMN dentro da região citada.

Ainda, podem ser observadas algumas amostras com escores negativos em PC2 e, como todos os sinais possuem pesos positivos em PC2 (parte de baixo da Figura 38), infere-se que estas amostras são aquelas com as menores intensidades dos sinais mostrados.

Figura 38 - Gráficos de pesos relativos à primeira (PC1) e à segunda (PC2) componentes principais obtidas na PCA do conjunto de dados.



7 DISCUSSÃO

Não restam dúvidas de que a OCD é uma das doenças que apresentam maior complexidade, tanto para a determinação de fatores etiológicos e desenvolvimento de lesões, como na dificuldade de estabelecimento precoce do diagnóstico, justificando esforços na busca por métodos eficientes de identificação de biomarcadores sensíveis e de elevada especificidade. A abordagem metabolômica vem ao encontro dessa necessidade, fornecendo técnica abrangente, pouco invasiva, rápida e de tempo real das alterações presentes na cavidade articular, podendo atuar como ferramenta no diagnóstico e avaliação da progressão da doença, baseada no processo metabólico.

A análise de ^{1}H RMN demonstrou alta reprodutibilidade entre as amostras, apresentando padrões consistentes entre diferentes amostras de um mesmo grupo, e entre amostras de grupos diferentes, com exceção dos metabólitos característicos para determinada condição. Esta reprodutibilidade também ocorreu entre amostras recém-colhidas e amostras armazenadas em freezer -80°C com períodos de congelamento variando de um a cinco anos. Este fato caracteriza outra vantagem do método, de se mostrar sensível e estável o suficiente para detectar os metabólitos contidos em amostras não frescas. Isto possibilita ao pesquisador armazenar as amostras a serem avaliadas por longos períodos, e ainda utilizar amostras colhidas anteriormente para outros fins.

Até o presente momento não é de nosso conhecimento a realização de avaliações por espectroscopia de ^{1}H RMN no líquido sinovial de equinos acometidos por OCD. As pesquisas com a utilização desta técnica ainda são bastante escassas na Medicina Veterinária. Especificamente em equinos, existe apenas uma descrição da análise metabolômica do líquido sinovial na osteoartrite e outra da análise metabolômica do soro de animais com OCD. Além disso, nenhum destes trabalhos apresentou os espectros além de 6.0 ppm (região aromática). Esta escassez justifica a necessidade do estabelecimento do padrão metabólico do líquido sinovial da articulação de equinos hígidos, pois pouco se sabe acerca do metabolismo articular em condições fisiológicas deste modelo animal. Espera-se que os resultados aqui contidos contribuam com as pesquisas existentes para futuras comparações entre indivíduos hígidos e indivíduos apresentando artropatias, à semelhança do que se tem na medicina humana.

Além da determinação do perfil metabólico de articulações hígidas, a identificação dos metabólitos presentes no líquido sinovial de articulações acometidas por OCD assintomática e sintomática vem somar aos conhecimentos já estabelecidos de biomarcadores articulares para

esta doença, auxiliando para o melhor entendimento do cenário presente na OCD, bem como da avaliação da resposta aos tratamentos.

7.1 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DIFERENCIAIS

De maneira geral, o perfil metabólico das articulações hígidas é bastante semelhante ao perfil de articulações com OCD assintomática e sintomática. A determinação deste perfil resultou num total de 32 metabólitos comuns entre os 3 tipos de articulações (Tabela 1) e outros 2 metabólitos presentes apenas nos animais com OCD (Tabela 2). Esta semelhança pode ser verificada em esquematização (Figuras 17 e 18) contendo o espectro e seus respectivos metabólitos, assinalados na região de seus deslocamentos químicos onde apresentassem o pico de maior intensidade. Nem todos os metabólitos estão presentes na figura, pois alguns apresentam sinais pouco intensos ou estão sobrepostos por picos maiores de outros compostos.

A avaliação dos espectros por comparação visual evidencia que os compostos propilenoglicol em 1.15 ppm (Figura 19) e o composto aromático em 7.0 a 7.15 ppm (Figura 20) diferem de maneira significativa entre as articulações hígidas e as acometidas por OCD. A ressonância do propilenoglicol está ausente nas amostras de articulações hígidas, estando presente em maior ou menor grau nas articulações com OCD assintomática e sintomática, sem diferenças entre os dois últimos. Já o composto aromático está ausente nas articulações hígidas, apresentando-se em pequenas intensidades em animais assintomáticos (à exceção de um animal) e em intensidades muito maiores em animais sintomáticos. O comportamento destes metabólitos será discutido em profundidade a seguir.

O método de escolha para a análise geral dos espectros foi a comparação entre as intensidades dos mesmos em cada pico dos metabólitos (Figuras 26 a 40). Como descrito anteriormente, os metabólitos glicose, glutamina, etanol, leucina, isoleucina, dimetil sulfona, creatina, creatinina, N-acetilglucosamina e N-acetilglutamina e τ-metil histidina, além dos picos já mencionados referentes ao propilenoglicol e composto aromático, foram os que apresentaram picos de maior intensidade para as articulações com OCD sintomática e assintomática quando comparadas às hígidas pela análise das intensidades dos espectros. Dos metabólitos que apresentaram redução na intensidade dos espectros das articulações doentes têm-se o 3-hidroxibutirato e o acetato. Outros metabólitos demonstraram a mesma intensidade de sinal para os três tipos de articulação. São eles: piruvato, citrato, metionina, histidina, tirosina, valina, lactato, alanina, glicina, glicerol e fenilalanina. Nesta discussão serão

apresentados apenas os metabólitos visíveis no espectro e que apresentaram diferenças entre as articulações estudadas.

7.1.1 Aminoácidos de Cadeia Longa

Os metabólitos leucina e isoleucina são aminoácidos essenciais, ou seja, aminoácidos que o organismo não é capaz de sintetizar, porém são requeridos para seu funcionamento. Compõem um terço dos músculos esqueléticos no corpo humano e têm papel fundamental na síntese de proteínas. São estruturalmente semelhantes, possuindo cadeias laterais alifáticas não lineares. (ZHAI et al., 2010). Os aminoácidos essenciais no plasma são controlados pelo mecanismo homeostático e as concentrações destes aminoácidos no liquido sinovial correspondem às presentes no plasma (MESHITSUKA et al, 1999).

A degradação dos aminoácidos ocorre através da glicólise, com reações específicas que transformam qualquer aminoácido em intermediários desta via. A degradação da leucina gera acetoacetato e acetil CoA (MARZZOCO; TORRES, 2007)

Neste estudo foram observados aumentos na intensidade dos picos referentes à leucina e isoleucina, nas articulações acometidas por OCD assintomática e sintomática, quando comparados ao grupo hígido. Resultados semelhantes foram encontrados por Damyanovich et al (1999) na análise por RMN de cães com osteoartrite e por Borel et al (2008), os quais identificaram o mesmo aumento em porquinhos-da-Índia com osteoartrite pós-meniscectomia. O aumento nos níveis de aminoácidos já foi reportado em estudos de digestão da cartilagem pela papaína, sendo atribuído à quebra de rede de colágeno (SCHILLER, 1995). Acreditamos que o aumento da concentração dos aminoácidos na OCD esteja relacionado à sua liberação em decorrência da degradação das proteínas. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que estes aminoácidos não são sintetizados pelo organismo, implicando que o aumento na sua concentração esteja associado, exclusivamente, a uma maior taxa de quebra das proteínas (ZHAI et al., 2010). No entanto, parece contraditório observar que não foram evidentes alterações entre articulações hígidas e com OCD, na intensidade dos picos dos metabólitos prolina, lisina, glicina e alanina, que são os aminoácidos presentes em maior quantidade no colágeno da cartilagem (SCHOFIELD et al, 1971) Cabe ressaltar que a avaliação dos picos destes aminoácidos fica comprometida pelo método de análise escolhido, pois seus picos são pequenos e sobrepostos por outros aminoácidos, havendo a possibilidade de sua presença estar subestimada neste estudo.

7.1.2 3-Hidroxibutirato

Na presença de combustíveis suficientes, os ácidos graxos são sintetizados, esterificados e liberados do fígado para o tecido adiposo. Quando há falta de energia, estes ácidos são convertidos em corpos cetônicos pelo fígado (BERG et al., 2002).

Damyanovich et al (1999a), descreveram um aumento de 21 vezes na concentração de corpos cetônicos no líquido sinovial de cães com osteoartrite induzida.O aumento observado nas concentrações de corpos cetônicos sugere que o metabolismo da gordura represente um papel importante como fonte energética na osteoartrite, enquanto a glicólise é predominante na articulação saudável. A doença, possivelmente, reduz o fluxo de metabólitos do sangue para os tecidos, resultando em redução na disponibilidade da glicose, o que somado ao aumento da demanda metabólica resultam em aumento da utilização da via lipolítica.

No presente estudo, foi observada a redução na intensidade dos picos do 3-hidroxibutirato nas articulações com OCD assintomática e sintomática, com relação às articulações hígidas. Além disso, não foram detectadas alterações nas intensidades dos outros corpos cetônicos (acetoacetato e acetona, presentes em baixa intensidade e não visíveis no espectro apresentado nas figuras 17 e 18). Estes resultados indicam que nas articulações com OCD não há um desvio metabólico para a cetogênese, a exemplo do que ocorre na osteoartrite, onde há aumentos dos corpos cetônicos que funcionam como suprimento energético nas condições inflamatórias.

7.1.3 Creatina e Creatinina

A creatina é um aminoácido presente nos tecidos e na urina. É sintetizada a partir da arginina, S-adenosil-metionina e glicina pelo pâncreas e fígado (WALKER et al, 1979). A creatinina é o subproduto excretado do metabolismo da creatina durante a quebra muscular por conversão não-enzimática, sendo excretada subsequentemente pela urina (SNOW et al, 2001). Estes metabólitos podem ser utilizados como índice da quebra do tecido muscular e que sua excreção aumenta de acordo com a intensidade e tempo de exercício (MUÑOZ et al, 2002).

Verificou-se o aumento das intensidades da creatina e creatinina em articulações com OCD assintomática e sintomática, e intensidades menores e constantes entre as articulações hígidas. O aumento destes metabólitos também já foi correlacionado com artropatias por Williamson et al (1989), em humanos apresentando osteoartrite, artrite reumatóide ou efusões

traumáticas. Níveis aumentados destes metabólitos também foram verificados por Damyanovich et al (1999) em cães com osteoartrite e por Lacitignola et al, 2008, em equinos com osteoartrite. Não se sabe ao certo o papel destes metabólitos no ambiente articular e se o aumento desta substância no interior da articulação seja devido à maior permeabilidade da membrana sinovial em decorrência da inflamação secundária, refletindo processos de degradação em músculo próximos da articulação, ou o resultado da atividade metabólica no interior desta cavidade. No entanto, podemos associar a presença destes metabólitos em maior intensidade nos animais doentes com o fato de que estes são, em sua grande maioria, animais atletas com mais massa muscular do que os animais utilizados no grupo controle.

Acreditamos que futuras mensurações dos níveis destes metabólitos no líquido sinovial sejam importantes para que se estabeleça uma correlação do seu aumento com a doença.

7.1.4 Composto Aromático

O composto aromático apresentando ressonância em torno de 7.0 ppm foi o grande responsável pela diferenciação entre as 3 condições articulares de OCD assintomáticas, OCD sintomáticas e hígidas. Esta clara variação foi demonstrada pela simples comparação visual, bem como pela intensidade dos espectros e pelos métodos estatísticos de escores e pesos da PCA. Através dele foi possível realizar o agrupamento das amostras e determinar o papel deste composto na identificação das articulações doentes.

No entanto, não foi possível realizar a identificação do metabólito aromático apresentado em 7.0 ppm, pois o software de identificação, bem como as bases de dados públicas, não o continham. A literatura consultada não mostra os espectros em frequências acima da água, o que corresponderia à região aromática. Na tentativa de elucidação, um dos espectros das articulações apresentando OCD foi enviado diretamente para a empresa responsável pelo software (ChenomX Inc. – Edmonton, Canadá), a qual possui um banco de dados mais abrangente. Porém, o reconhecimento não foi possível por não se tratar de um metabólito já determinado. Acredita-se que este metabólito possa ser fundamental na detecção da OCD, tendo em vista sua presença, em maior ou menor grau, em todos os animais doentes, e sua concomitante ausência em todos os animais hígidos. É provável tratar-se de um composto relacionado ao metabolismo na doença, considerando-se que as articulações com OCD assintomática o apresentem em seu espectro em menor quantidade, quando comparados ao grupo sintomático. No entanto, a possibilidade deste composto estar relacionado à

administração de fármacos anestésicos durante o procedimento cirúrgico impede que o consideremos, no momento, como um biomarcador da doença. De posse destas informações julgamos de fundamental importância sua futura identificação.

7.1.5 Dimetil sulfona

A dimetil sulfona ($DMSO_2$)é um composto exógeno gerado a partir da degradação do dimetil sulfóxido (DMSO). comum no plasma de mamíferos, e em humanos pode ser oriundo da alimentação ou do metabolismo do metanetiol, derivado da flora bacteriana intestinal (ENGELKE et al, 2005). Este composto apresentou intensidades aumentadas em algumas articulações doentes e hígidas. Sua origem neste estudo é incerta, no entanto, pode estar relacionada a contaminantes na alimentação e à administração de fármacos tópicos e sistêmicos, visto que a utilização do DMSO é corriqueira na medicina veterinária, apesar de que grande parte dos equinos com OCD não possuíam histórico de administração de medicamentos na propriedade de origem.

Estudos com osteoartrite em humanos e ovelhas já identificaram aumentos na concentração deste metabólito na urina e no soro, respectivamente (LAMERS et al, 2005; MAHER et al, 2012). É curioso observar seu aumento em estudos com artropatias, uma vez que este composto é conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias (SMITH et al, 1998) e pesquisas têm sido conduzidas no sentido de investigar seu efeito terapêutico nas doenças articulares (EZAKI et al, 2013).

7.1.6 Etanol

As ressonâncias referentes ao etanol não apresentaram um comportamento característico, estando aumentadas em alguns espectros somente, tanto em articulações doentes quanto em hígidas. Este composto não foi identificado previamente em nenhum dos artigos científicos consultados. Por não se tratar de um componente endógeno, a presença deste composto está, muito provavelmente, relacionada à absorção pela aplicação de álcool sobre a articulação no momento da antissepsia que antecedeu a artrocentese.

7.1.7 Glicose

A glucose é a fonte primária de energia nos organismos e tem sua origem na quebra do glicogênio que ocorre na glicogenólise. A glicose é sintetizada no fígado e rins de intermediários não-carboidratos, como o piruvato e o glicerol, pelo processo conhecido como gliconeogênese (BERG et al, 2002). Verificou-se o aumento da intensidade de glicose nas articulações com OCD sintomática e assintomática, quando comparados ao grupo hígido. Sabe-se que os níveis de glicose aumentam progressivamente de acordo com a severidade da OA em humanos e modelos caninos (NAUGHTON et al., 1993; DAMYANOVICH et al, 1999ª). Como mencionado anteriormente, a manutenção e reparação da cartilagem articular são de responsabilidade dos condrócitos. O desempenho desta função depende dos estoques energéticos, sendo que a taxa de síntese da MEC está intimamente ligada à disponibilidade de ATP. Portanto, na presença de lesões cartilagíneas decorrentes de injúrias mecânicas, há um aumento na demanda deste nucleotídeo, o qual é fornecido a partir do processo de glicólise (MARTIN et al, 2012).

Acreditamos que o aumento deste metabólito esteja relacionado tanto ao processo de gliconeogênese, na tentativa de formar mais glicose a partir de aminoácidos, quanto do processo de glicólise, visto que as duas vias podem ocorrer simultaneamente.

7.1.8 Glutamina

A glutamina é um aminoácido não essencial presente em abundância no organismo e envolvido em diversos processos metabólicos. É sintetizada do ácido glutâmico e amônia, sendo o principal carreador de nitrogênio no corpo e uma importante fonte de energia celular (BERG et al, 2002). O aumento dos níveis de glutamina no líquido sinovial é atribuído à degradação do líquido sinovial e de proteínas pelos radicais livres (PARKES et al, 1991). Sabe-se que a glutamina é um dos principais componentes da COMP (HEDBOM et al, 1992). É possível que o aumento na intensidade da ressonância deste metabólito esteja relacionado à quebra de proteínas da matriz cartilagínea.

7.1.9 N-acetilglutamina e N-acetilglucosamina

Muito provavelmente, os resultados mais importantes relacionados à análise metabolômica do líquido sinovial de animais com OCD assintomática e sintomática seja a

elevação da intensidade do grupo N-acetil. O espectro da ^{1}H RMN já se demonstrou capaz de detectar com precisão os produtos da degradação da cartilagem, representados pela ressonância de frações do N-acetil do condroitim sulfato e ácido hialurônico, e aminoácidos do colágeno. (BELL et al, 1987; UCHIYAMA et al, 1990; PARKES et al, 1991; SCHILLER et al, 1995; SCHILLER et al, 2001; BOREL et al, 2009). A tendência ao aumento da intensidade de sinal com a severidade da doença pode ser atribuída ao resultado direto da quebra da matriz extracelular da cartilagem, e consequente liberação dos polissacarídeos que se tornam mais móveis e detectáveis (SCHILLER et al, 1995; GROOTVELD et al, 1991). Alterações na intensidade deste pico são consideradas de fundamental importância no monitoramento da progressão das doenças articulares (DAMYANOVICH et al 1999b).

O desequilíbrio entre o *turnover* dos proteoglicanos e a degradação dos mesmos pode ocorrer com o avanço da degeneração da cartilagem, sugerindo que a síntese dos proteoglicanos não seja capaz de manter seu conteúdo em níveis fisiológicos. Em estágios severos da doença articular, os produtos da fragmentação da matriz extracelular são liberados no liquido sinovial (MESHITSUKA et al, 1999; DAMYANOVICH et al, 1999) e a intensidade do sinal do grupo N-acetil difere entre os estágios iniciais e mais avançados da doença articular (BOREL et al, 2009). Este aumento condiz com os níveis de proteoglicanos na cartilagem articular analisados por Borel et al (2009) por ensaios bioquímicos, os quais encontravam-se significativamente reduzidos, sugerindo um severo processo de degradação da matriz cartilagínea.

Já se sabe que na sinovite os sinoviócitos mecanicamente lesados podem liberar enzimas de degradação, citocinas e radicais livres, e que estes alteram o ambiente articular e afetam a cartilagem articular (McILWRAITH, 2001). Os radicais livres, especialmente o radical hidroxila, altamente reativo, desempenham papel importante no processo de despolimerização do ácido hialurônico e dos proteoglicanos na inflamação articular (UCHIYAMA et al, 1990). Esta despolimerização ocorre pela clivagem oxidativa direta das ligações glicosídicas entre o N-acetil e o glucuronato. A clivagem origina espécies de oligossacarídeos contendo N-acetilglucosamina de baixo peso molecular, com grande mobilidade em meio aquoso (GROOTVELD, 1991), determinando a redução da viscosidade do líquido sinovial (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984).

Em estudo conduzido por Machado (2010), observou-se a degradação das proteínas oligoméricas da matriz cartilagínea (COMP) na OCD sintomática e assintomática em equinos. Verificou-se o aumento da presença de fragmentos de baixo peso molecular quando comparados aos fragmentos de alto peso molecular, como resultado da degradação da MEC e

do aumento da síntese de proteínas pelos condrócitos, na tentativa de reparação da lesão. Da mesma maneira, acreditamos que neste estudo, o aumento da intensidade dos espectros nos picos do grupo N-acetil esteja, igualmente, associado à degradação da cartilagem e quebra dos glicosaminoglicanos.

Na osteoartrite e artrite reumatóide, a despolimerização do grupo N-acetil resulta em aumento da intensidade do acetato, sendo este considerado o produto final da degradação destes metabólitos (DAMYANOVICH, 1999b; SCHILLER et al, 1995). No entanto, este comportamento não foi observado para os animais deste estudo, os quais apresentaram picos de acetato semelhantes para as articulações hígidas e doentes. Isso se deve ao fato de que, provavelmente, o componente inflamatório não está tão ativo como nas osteoartrites, porém, a degradação da cartilagem está presente.

Não foi é possível determinar quanto da degradação demonstrada é oriunda do componente inflamatório secundário, mediado pelos radicais livres, ou de fatores mecânicos alterados pela presença do fragmento no interior da cavidade articular e pela mudança do equilíbrio das forças na articulação. Estudos *in vitro* já demonstraram que traumas mecânicos na cartilagem articular são suficientes para desencadear danos físicos imediatos à rede de colágeno (WILSON et al, 2006) e respostas biológicas que levam ao aumento do *turnover* da MEC (QUINN et al, 1998a; QUINN et al, 1998b), além de aumento significativo na degradação da cartilagem (HOWELL et al, 1992; DING et al, 2010).

Estabelecendo-se a relação entre o aumento da N-acetilglucosamina e aumento da glicose, a hipótese de aumento por estímulo da síntese de glicosaminoglicanos, glicoproteínas e glicolipídios deve ser considerada, principalmente na condição da OCD, onde o metabolismo tenta restabelecer a homeostase e a cartilagem busca mecanismo de reparação do tecido lesado. Seria interessante correlacionar os dados aqui obtidos com outros tipos de ensaio com biomarcadores relacionados à degradação da cartilagem articular, para melhor compreensão de quanto deste resultado está realmente relacionado à degradação da cartilagem ou à síntese destes componentes.

7.1.10 Propilenoglicol

O propilenoglicol é uma substância sintética, não pertencente ao metabolismo, utilizada como veículo para diversos medicamentos tópicos, orais e sistêmicos, entre eles os fármacos anestésicos. Neste estudo, observamos intensidades aumentadas deste composto nas articulações com OCD, quando comparadas às articulações hígidas, sendo que as articulações

sintomáticas apresentaram-se mais elevadas do que as assintomáticas. A presença deste composto não foi descrita em pesquisas com articulações. Na verdade, este composto foi mencionado na literatura científica em apenas um estudo com líquido cefalorraquidiano na lesão cerebral traumática em pacientes humanos, porém não foi estabelecida a sua relação com o metabolismo nem seu papel neste tipo de lesão (GLENN et al, 2013). Acreditamos que um viés nas análises poderia ser apontado para o fato de que os animais do grupo controle não tenham sido submetidos às mesmas condições de colheita do que os doentes. É considerado provável que as medicações utilizadas na anestesia dos equinos submetidos à artroscopia tenham se difundido rapidamente e atravessado a membrana sinovial, atingindo desta maneira nosso objeto de estudo, o líquido sinovial.

Sabe-se que as artropatias promovem um aumento da permeabilidade da membrana sinovial (SIMKIN et al, 2011). Este fato explicaria as diferentes intensidades deste metabólito nas amostras de articulações com OCD, resultantes de diferentes níveis de aumento da permeabilidade da membrana sinovial em decorrência do processo inflamatório secundário, variando de acordo com a severidade da doença. Futuras análises metabolômicas do líquido sinovial de articulações hígidas de animais submetidos à anestesia se farão necessárias para uma comparação mais precisa e para que se descarte a influência de fatores externos, não relacionados ao metabolismo articular.

Com o intuito de descartar a influência de compostos exógenos sobre o líquido sinovial realizou-se a análise metabolômica dos principais medicamentos ou produtos que, possivelmente ou sabidamente, foram utilizados nos animais antes de sua chegada ou durante sua permanência no hospital veterinário. Para isto, foram analisadas amostras de anti-inflamatórios (cetoprofeno, meloxicam, flunixim meglumine, fenilbutazona), anestésicos locais (lidocaína), antibióticos (amicacina, rifamicina em spray) e antissépticos (digluconato de clorexidine alcoólico 0,5%, digluconato de clorexidine degermante 2%, iodopovidine degermante). Os espectros destes compostos foram confrontados com os espectros obtidos a partir do líquido sinovial de articulações hígidas e com OCD, não sendo identificadas similaridades entre os mesmos, o que indica que os compostos em questão não estavam presentes nas amostras analisadas.

7.1.11 τ-metil histidina

A τ -metil histidina é aminoácido derivado da síntese de peptídeos e da metilação da actina e miosina. Sua mensuração reflete a quebra destas proteínas e fornece

dados acerca do índice de degradação do tecido muscular. Após a quebra, este aminoácido é excretado, não sendo reutilizado para a síntese proteica (ELIA et al, 1981). Sua mensuração já foi proposta como um biomarcador da proteólise miofibrilar, o que pode contribuir para a perda de massa muscular (ARANIBAR et al, 2011).

As intensidades dos picos da τ-metil histidina aparecem aumentadas em articulações com OCD quando comparadas às hígidas. Acreditamos que o aumento deste metabólito esteja relacionado à degradação do tecido muscular, à semelhança do que ocorre com a creatina e creatinina.

De maneira geral, os espectros das articulações com OCD assintomática e sintomática não apresentaram diferenças significativas. Os únicos metabólitos em que essa diferença se mostrou mais evidente foram o propilenoglicol e o composto aromático. Além disso, a não quantificação dos metabólitos não permite a afirmação concreta desta semelhança. É necessário conhecer a concentração e estabelecer a relação entre os metabólitos para que se extraia o correto significado metabólico destas alterações.

Não se sabe ao certo o efeito da diluição na concentração dos metabólitos pelo aumento de volume articular decorrente da efusão sinovial. Provavelmente os animais apresentando maior grau de efusão tiveram seus metabólitos subestimados em virtude deste efeito. Além disso, para algumas amostras o volume obtido durante a colheita foi menor do que 0,5ml, sendo necessária a adição de maior volume do solvente água deuterada para que fosse possível realizar a leitura no aparelho de ressonância magnética. Com isto, as amostras de menor volume colhido sofreram uma maior diluição, o que refletiu diretamente no espectro, gerando perfis com pior razão sinal-ruído, sendo mais difícil a normalização do espectro e a visualização dos metabólitos, os quais ficavam sobrepostos pelo ruído.

Os animais do grupo controle possuíam idade mais avançada do que os do grupo doente, formado em sua maioria por cavalos novos acima de três anos. Sabe-se que o metabolismo articular tem demandas diferentes de acordo com a idade dos indivíduos. Além disso, não se sabe exatamente a influência do escore corporal, da alimentação e do nível de atividade física nos metabólitos presentes no líquido sinovial. Por se tratarem de animais de origens, raças e utilização diferentes, o controle destas variáveis torna-se infactível. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os animais do grupo controle, grupo este composto por cavalos de idades, raças e manejos nutricionais distintos.

7.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística por PCA foi realizada, inicialmente, como uma avaliação global dos espectros, considerando-se toda a sua frequência de 0 a 8.0 ppm. No entanto, esta análise não rendeu resultados satisfatórios, visto que os picos mais altos (água, açucares e lactato) sobrepunham-se aos menores, impossibilitando a comparação das regiões de interesse e não havendo agrupamento entre amostras. Desta forma, optou-se por isolar uma região específica do espectro, correspondente à região do composto aromático de 6.8 a 7.8 ppm, pelo fato de que nesta região havia sido detectada a maior diferenciação entre os espectros de articulações doentes quando comparadas às hígidas, sendo possível identificar os indivíduos doentes através da observação deste metabólito apenas. Neste caso, o gráfico de escores da PCA demonstrou uma clara divisão entre as articulações com OCD assintomática e sintomática com relação às articulações hígidas, com grande grau de semelhança entre os indivíduos sadios e separação dos indivíduos doentes (Figura 22). Esta avaliação demonstrou um agrupamento mais consistente das articulações sadias, com relação às amostras de articulações doentes, com as duas primeiras componentes (PC1 e PC2) explicando 83,3% das variações entre os espectros. As amostras das articulações hígidas apresentaram bom agrupamento, sendo a grande maioria positiva para PC1. Já as amostras das articulações com OCD assintomática e sintomática apresentaram um padrão mais disperso, apesar da maioria ser positiva para PC2. Aparentemente, as amostras hígidas são mais semelhantes entre si, enquanto as doentes possuem maiores variações. Este comportamento das amostras é esperado, considerando-se que os animais doentes podem apresentar diferentes níveis de demanda metabólica e de comprometimento da cartilagem, além de alterações secundárias, como a sinovite ou osteoartrite, gerando picos de intensidades variadas. Além da separação entre grupos, a PCA forneceu através da correlação entre os gráficos de escores e pesos, a confirmação do papel do composto aromático na identificação de indivíduos doentes (Figura 23).

7.3 COMPARAÇÃO DA ANÁLISE METABOLÔMICA DE DIFERENTES BIOFLUIDOS NA OCD EQUINA

Confrontando-se os resultados por nós obtidos com os apresentados por Ralston et al (2009) há discrepância com relação às concentrações dos metabólitos encontrados. De acordo com estudo por eles realizado com o soro sanguíneo de potros de 1 ano de idade, houve aumento dos metabólitos colina, tirosina, treonina, albumina, e beta-glucose, e redução de outros oito aminoácidos, lipoproteínas de baixa densidade e lipídios. Acreditamos que a disparidade entre os resultados ocorra pela escolha do biofluido. A análise metabolômica do soro sofre influência de todos os compostos presentes no sangue, inclusive aqueles grandes demais pra atravessar a membrana sinovial e que, portanto, não estão presentes no líquido sinovial.

7.4 COMPARAÇÃO ENTRE A ANÁLISE METABOLÔMICA DO LÍQUIDO SINOVIAL NA OCD E OSTEOARTRITE EQUINAS

A análise metabolômica do líquido sinovial na osteoartrite rende perfil metabólico completamente distinto do perfil da OCD. Para esta enfermidade, têm-se o aumento dos metabólitos 3-hidroxibutirato, acetato, acetona, alanina, citrato, creatina, creatinina, glicerol, glutamato, lactato, tirosina e grupo N-acetil. Ainda, alguns autores descrevem redução inicial nas concentrações de glicose, com posterior aumento relacionado à severidade da doença (NAUGHTON et al, 1993, DAMYANOVICH et al, 1999A, DAMYANOVICH et al, 1999B, LACITIGNOLA et al, 2008).

Este perfil revela o ambiente acidótico, “hipoglicêmico” e hipóxico, com aumento do metabolismo anaeróbio, no qual a glicólise dá espaço para a lipólise como fonte de energia principal, acompanhado da degradação dos componentes da matriz cartilagínea. Já na OCD, aparentemente, não há um desvio metabólico. Apesar das diferenças no diagnóstico, etiologia e sinais clínicos, a OCD e a osteoartrite compartilham uma característica em comum: a degradação da cartilagem articular.

É interessante notar que Maher et al (2012), obtiveram resultados semelhantes aos nossos em sua investigação com osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior em ovinos. Estes autores apresentaram como resultados aumentos das concentrações de τ -metil histidina, $DMSO_2$, glutamina, creatina e creatinina na avaliação do

líquido sinovial 12 semanas após o procedimento cirúrgico, com redução dos aminoácidos de cadeia longa, leucina e isoleucina e sem menção aos dados da glicose. Os resultados por eles obtidos divergem da literatura, por não apresentarem aumento nos compostos relacionados à inflamação e alteração da via metabólica. No entanto, os autores não fazem correlação dos dados com a inflamação em si.

7.5 CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A não quantificação dos metabólitos encontrados foi considerada uma limitação deste estudo. A avaliação concentrou-se na identificação do perfil metabólico, na determinação de marcadores presentes ou ausentes na doença e na comparação da intensidade dos espectros. Certamente, a futura quantificação dos metabólitos em termos de sua concentração nas amostras se fará necessária e renderá ainda mais resultados passíveis de serem relacionados com a doença em questão. Ainda, considerando-se a alta sensibilidade deste tipo de técnica, a presença de comorbidades poderia alterar o perfil da amostra estudada. Por este fato, consideramos importante realizar, além das quantificações dos metabólitos, as relações internas entre as concentrações destes, para que se tenham dados específicos e sem interferências do metabolismo local.

Julgamos interessante a futura realização de análise e acompanhamento de potros até um ano de idade, com o intuito de estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos no presente estudo e os obtidos na fase de instalação da OCD, ainda sem a interferência do componente inflamatório e das alterações secundárias. A comparação destas análises seria fundamental para a melhor compreensão da patogenia desta doença, identificando a via metabólica responsável, ou mesmo para detecção de animais “em risco” ou com maior predisposição para o desenvolvimento da doença.

Atualmente, a técnica de ^{1}H RMN tem sido utilizada na rotina de Hospitais de todo o mundo para a avaliação e diagnóstico diferencial de uma gama de tumores, incluindo os de próstata e de ovário em humanos. O método descrito ainda não é utilizado na rotina dos hospitais veterinários, porém, este tipo de avaliação poderia ser facilmente realizada em parceria com centros de pesquisa, como o Instituto de Química da UNICAMP, no qual o valor de análise do perfil metabólico de uma amostra estaria bem abaixo do custo de obtenção de kits específicos para um único marcador de inflamação ou degradação da cartilagem, com todas as vantagens já mencionadas.

Os resultados aqui contidos são dados preliminares e apresentam a técnica da 1H RMN como um método vantajoso com relação às técnicas de determinação de biomarcadores, por demonstrarem o estado global e em tempo real da doença estudada. O completo significado de tais alterações será compreendido somente quando a cinética do influxo/*clearance* e síntese/quebra dos metabólitos relevantes em relação ao líquido sinovial forem melhor esclarecidos.

No entanto, estes resultados abrem portas a novas possibilidades, como a utilização desta técnica na comparação entre o metabolismo articular nas artropatias, na avaliação da resposta metabólica articular ao exercício em cavalos atletas, na avaliação seriada para acompanhamento da progressão das doenças, na identificação do que ocorre no metabolismo articular na artrite séptica, no monitoramento da resposta ao tratamento instituído, para citar alguns exemplos.

Projetamos que, no futuro, o papel da metabolômica nas artropatias seja de uma ferramenta clínica, na qual a amostra de líquido sinovial dos pacientes seja utilizada para a determinação de um painel de marcadores biológicos, similarmente ao que se tem na avaliação de um hemograma ou exame bioquímico. Alterações nos perfis metabólicos podem indicar progressão da doença em uma resolução muito superior às técnicas laboratoriais empregadas atualmente. A aplicação das tecnologias genômicas e metabolômicas, tidas atualmente como *state-of-the-art*, nos auxiliará na melhor compreensão da patofisiologia e progressão da OCD, bem como na descoberta de uma nova geração de biomarcadores, sendo ainda possível a avaliação da atividade terapêutica de fármacos a nível molecular.

A transferência do conhecimento da metabolômica da bancada para a rotina clínica ilustra o paradigma da pesquisa translacional. Este tipo de pesquisa engloba diversos campos de estudo e por este motivo a interdisciplinaridade é um fator fundamental que deve nortear as análises nesta área, para que se obtenha sucesso na avaliação dos resultados e que estes sejam cada vez mais consistentes. A associação de diversas áreas de interesse no estudo do metabolismo articular e as suas repercussões clínicas são fundamentais na compreensão e esclarecimento das entidades patológicas com sede osteoarticular.

8 CONCLUSÃO

A análise metabolômica determinou o perfil metabólico do líquido sinovial de equinos, apresentando como resultado 32 metabólitos presentes neste biofluido de articulações hígidas e com OCD, além de outros dois metabólitos presentes somente em articulações com OCD assintomática e sintomática. A espectroscopia de ^{1}H RMN do líquido sinovial de equinos revela claras diferenças entre os perfis bioquímicos de articulações hígidas e acometidas por OCD, indicativo das alterações metabólicas que ocorrem com a progressão desta doença, relacionadas principalmente com o processo de degradação cartilagínea. As análises estatísticas associadas a esta avaliação foram capazes de agrupar indivíduos com condições semelhantes e indicar possíveis compostos relacionados à doença. O perfil metabólico determinado para as articulações hígidas diferem em intensidade e em número de compostos das articulações com OCD. Porém, não foi possível diferenciar as articulações com OCD assintomática das articulações sintomáticas, pois ambos os grupos apresentavam metabólitos semelhantes e em intensidades muito similares.

Estes resultados são ainda preliminares em termos de aplicação clínica, e uma posterior caracterização e quantificação se fazem necessárias, avaliando a capacidade dessa técnica na identificação precoce da doença ou mesmo no monitoramento da evolução clínica do paciente baseada no metabolismo articular. Contudo, este estudo salienta o potencial da análise metabolômica em fornecer uma nova perspectiva dos processos bioquímicos envolvidos na progressão da OCD.

REFERÊNCIAS

ADAMS JR., S. B; SETTON, L. A. ; KENSICKI, E. ; BOLOGNESI, M. P. ; TOTH, A. P. ; NETTLES, D. L. Global metabolic profiling of human osteoarthritic synovium. **Osteoarthritis and Cartilage,** v. 20, p. 64-67, 2012.

ARANIBAR, N.; VASSALLO, J. D.; RATHMACHER, J.; STRYKER, S.; ZHANG, Y.; DAI, J.; JANOVITZ, E. B.; ROBERTSON, D.; REILY, M.; LOWE-KRENTZ, L.; LEHMAN-McKEEMAN, L. Identification of 1- and 3-methylhistidine as biomarkers of skeletal muscle toxicity by nuclear magnetic resonance-based metabolic profiling **Analytical Biochemistry.** v.410, p. 84–91, 2011.

BACCARIN, R. Y. A. ; PEREIRA, M. A. ; RONCATI, N. V. ; FURTADO, P. V. ; OLIVEIRA, C. A. ; HAGEN, S. C. F. Identificação dos níveis séricos do fator de crescimento tipo insulina 1 em potros com osteocondrose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 677-682, 2011.

BANKS, W. J. Musculoskeletal system. In: **Applied veterinary histology**. Williams & Wilkins, 2 ed., Baltimore, 1968,4ª ed., pp. 259-278.

BARTHI, S. K. ; BEHARI, A, ; KAPOOR, V. K. ; KUMARI, N. ; KRISHNANI, N, ; ROY, R. Magic angle spinning NMR spectroscopic metabolic profiling of gall bladder tissues for differentiating malignant from benign disease. Metabolomics, v. 9, p. 101-118, 2013.

BELL, J.D.; BROWN, J.C.C.; NICHOLSON, J.K.; SADLER, P.J. Assignment of resonances for ‘acute-phase’ glycoproteins in high resolution proton NMR spectra of human blood plasma **FEBS Letters.** v. 215, n. 2, p. 311-315, 1987.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. ; STRYER, L. Exploring proteins: Nuclear Magnetic Resonance can reveal the structures of protein solutions. In: W. H. Freeman, **Biochemistry**, 5 ed. New York, 2002, p. 77-115.

BILLINGHURST, R. C. ; BRAMA, P. A. ; VAN WEEREN, P. R. ; KNOWLTON, M. S. ; MCILWRAITH, C. W. Evaluation of serum concentrations of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals. **American Journal of Veterinary Research, v**. 65, n. 2, p. 143-50, 2004.

BODI, V.; MARRACHELLI, V. G.; HUSSER, O.; CHORRO, F. J.; VIÑA, J. R.; MONLEON, D. Metabolomics in the Diagnosis of Acute Myocardial Ischemia, **Journal of Cardiovascular Trans. Research**, vol. 6, pp. 808–815, 2013.

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

BOREL, M.; PASTOUREAU, P.; PAPON, J.; MADELMONT, J.C.; MOINS, N.; MAUBLANT, J.; MIOT-NOIRAULT, E. Longitudinal profiling of articular cartilage degradation in osteoarthritis by high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy: experimental study in the meniscectomized guinea pig model. **Journal of Proteome Research.** v. 8, p. 2594–2600, 2009.

BRINK, P. ; DOLVIK, N. L. ; TVERDAL, A. Lameness and effusion of the tarsocrural joints after arthroscopy of osteochondritis dissecans in horses. **Veterinary Record**, v. 165, p. 709-712, 2009.

BUSTILLO, J. R. Use of proton magnetic resonance spectroscopy in the treatment of psychiatric disorders: a critical update. **Dialogues in Clinical Neuroscience**. v. 15, p. 329-337, 2013.

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

CARLSTEN, J. ; SANDGREN, B. ; DALIN, G. Development of osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints of standardbred trotters. i. a radiological survey. Equine Veterinary Journal Supplement, v. 25, n. S16, p. 42–47, 1993.

CATTERALL, J. B.; STABLER, T. V.; FLANNERY, C. R.; KRAUS, V. B. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury. **Arthritis Research & Therapy**, v.12, p. 1-9, 2010.

CROVACE, A.; LATICIGNOLA, L.; MIOLO, A. Surgery plus chondroprotection for canine cranial cruciate ligament (CCL) rupture. A proton-NMR study. **Veterinary and Comparative Orthopaedia and Traumatology,** v. 19, p. 239-245, 2006.

CRUZ, R. S. F. Da. Tratamento cirúrgico da osteocondrite dissecante em equinos: estudo retrospectivo e análise crítica. [Surgical treatment of osteochondritis dissecans in horses: Retrospective study and analysis]. 2011. 95f**. Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CUPERLOVIC-CULF, M; BARNETT, D. A.; CULF, A; IANCHUTE, I. Cell culture metabolomics: applications and future directions. **Drug Discovery Today.** v. 0, n.0, 2010.

DAMYANOVICH, A. Z.; STAPLES, J. R.; CHAN, A. D. M.; MARSHALL, K. W. Comparative study of normal and osteoarthritic canine synovial fluid using 500 MHz 1H magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 17, p. 223-231, 1999a.

DAMYANOVICH, A. Z.; STAPLES, J. R.; MARSHALL, K. W. ^{1}H NMR investigation of changes in the metabolic profile of synovial fluid in bilateral canine osteoarthritis with unilateral joint denervation. **Osteoarthritis and Cartilage,** v.7, p. 165-172, 1999b.

DE GRAUW, J. C.; BRAMA, P. A.; WIEMER, P.; BROMMER, H.; VAN DE LEST, C. H.; VAN WEEREN, R. Cartilage-derived biomarkers and lipid mediators of inflammation in horses with osteochondritis dissecans of the distal intermediate ridge of the tibia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 7, p. 1156-1162, 2006.

DENOIX, J. M.; AUDIGIÉ, F. Imaging of the musculoskeletal system in horses.Chapter-10. In: Hinchcliff, K.W.; Kaneps, A.J. and Geor, R.J., **Equine Sports Medicine and Surgery – basic and clinical sciences of the equine athlete.** Philadelphia: Elsevier, 2004, p. 161-186.

DEWEY, C. Diseases of the nervous and locomotor systems. In: STRAW, B.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. E TAYLOR, D. **Diseases of swine**. Oxford: Blackwell Science, 1999, ed. 8. p. 861-883.

DING, L.; HEYING, E.; NICHOLSON, N.; STROUD, N. J.; HOMANDBERG, G. A.; BUCKWALTER, J. A.; GUO, D.; MARTIN, J. A. Mechanical impact induces cartilage degradation via mitogen activated protein kinases. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, pp. 1509 - 1517, 2010.

DIK, K. J.; ENZERINK, E.; VAN WEEREN, P. R. Radiographic development of osteochondral abnormalities in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 31, p. 9-15, 1999.

EASTER, J. L.; WATKINS, J. P. Osteochondrosis and physitis. In: COLAHAN, P.T.; MAYHEW, I.G.; MERRIT, A.M.; MOORE, J.N. **Equine medicine and surgery**. 5 ed. St Louis: Mosby, 1999. p. 1475-1482.

EDMONDS, E. W.; POLOUSKY, J. A review of knowledge in osteochondritis dissecans: 123 years of minimal evolution from Konig to the ROCK study Group. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 471, n.4, p. 1118-1126, 2013.

EKMAN, S.; CARLSON, C. S. The pathophysiology of osteochondrosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 28, n. 1, p. 17–32, 1998.

ELIA, M.; CARTER, A.; BACON, S.; WINEARLS, C. G.; SMITH, R. Clinical usefulness of urinary 3-methylhistidine excretion in indicating muscle protein breakdown, **British Medical Journal**, v. 282, pp. 351-354, 1981.

ENGELKE, U. F. H ; TANGERMAN, A.; WILLEMSEN, M. A. A. P.; MOSKAU, D.; LOSS, S.; MUDD, S. H. ; WEVERS, R. A. Dimethyl sulfone in human cerebrospinal fluid and blood plasma confirmed by one-dimensional 1H and two-dimensional 1H-13C NMR. **NMR in Biomedicine**. v. 18, p.331–336, 2005

EZAKI, J.; HASHIMOTO, M.; HOSOKAWA, Y.; ISHIMI, Y. Assessment of safety and efficacy of methylsulfonylmethane on bone and knee joints in osteoarthritis animal model. **Journal of Bone Mineral Metabolism.** v.31, n. 1, p. 16-25, 2013.

FAN, T. W.; LANE, A. N.; HIGASHI, R. M.; FARAG, M. A.; GAO, H.;BOUSAMRA, M.; MILLER, D. M. Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (13)C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). **Molecular Cancer,** v. 8, n. 41, p. 8-41, 2009.

FITZPATRICK, M.A.; YOUNG, S.P. Metabolomics: a novel window into inflammatory disease, **Swiss Medical Weekly,** v. 143, 13743, 2013.

FLUGGE, L. A.; MILLER-DEIST, L. A.; PETILO, P. A. Towards a molecular understanding of arthritis. **Chemistry & Biology.** v. 6, p.157-166, 1999.

FOERNER, J.J. Osteochondrosis in the horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 23, n. 4, p. 142-145, 2003.

FOLAND, J.W.; MCILWRAITH, C.W.; TROTTER, G.W. Arthroscopic surgery for osteochondritis dissecans of the femoropatellar joint of the horse. **Equine Veterinary Journal,** v. 24, p. 419-423, 1992.

FORTIER, L.A.; NIXON, A.J. New Surgical Treatments for Osteochondritis Dissecans and Subchondral Bone Cysts. **Veterinary Clinics – Equine Practice**, v. 21, p. 673-690, 2005.

FRANCOLÍ, J.E; DELGADO, E.V; ESCODA, C.G. Scientific evidence on the usefulness of intraarticular hyaluronic acid injection in the management of temporomandibular dysfunction. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirurgía Bucal,** v. 4, p. 644-8, 2010.

FRISBIE, D Joint disease in the horse In: McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996.

FRISBIE, D. Synovial joint biology and pathobiology. In: AUER, J.A; STICK, J.A. **Equine Surgery**. 3 ed., Saunders Company, 2006, p. 1036-1055.

GARNERO, P.; ROUSSEAU, J.C.; DELMAS, P.D. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage and synovium in joint diseases. **Arthritis & Rheumatism,** v. 43, n. 5, p. 953-968, 2000.

GERBER, H. P.; VU, T. H.; RYAN, A.M.; KOWALSKI, J.; WERB, Z.; FERRARA, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nature Medicine**. v 5, p.623–628, 1999.

GLADE, M. J. The role of endocrine factors in equine developmental orthopedic disease. **Annual Convention Proceedings American Association of Equine Practitioners**, v. 33, p. 171-189, 1988.

GLENN, T. C.; HIRT, D.; MENDEZ, G.; MCARTHUR, D. L.; STURTEVANT, R.; WOLAHAN, S.; FAZLOLLAHI, F.; ORDON, M.; BILGIN-FREIERT, A.; ELLINGSON, B.; VESPA, P.; HOVDA, D. A; MARTIN, N. Metabolomic analysis of cerebral spinal fluid from patients with severe brain injury. **Acta Neurochirurgica,** vol. 118, pp. 115-119, 2013.

GØNDAHL, A. M.; DOLVIK, N. I. Heritability estimations of osteochondrosis in the tibiotarsal joint and of bony fragments in the palmar/plantar portion of the metacarpo- and metatarsophalangeal joints of horses. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 1, p. 101-104, 1993.

GOODACRE, R. , 2005 Metabolomics – the way forward**. Metabolomics**, vol. 1, n. 1, pp. 1-2, 2005.

GOWDA, G. A.; ZHANG, S.;GU,H.. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, p. 617-33, 2008.

GREENWALD, R.; MOY, W. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. **Arthritis Rheumatism,** v. 23, p. 455–463, 1980.

GROOTVELD, M.; HENDERSON, E. B.; FARRELL, A.; BLAKE,D. R.; PARKES, H. G.; HAYCOCK, P. Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint: detection of abnormal low-molecular-mass

metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy. **Biochemical Journal**, vol. 273, pp. 459-467, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal,** vol. 219, pp.1-14, 1984.

HARRISON, L. J.; EDWARDS, G. B. Radiographic investigation of osteochondrosis. **Equine Veterinary Education**, vol. 8, n. 3, p. 172-176, 1996.

HEDBOM, E.; ANTONSSON, P.; HJERPE, A.; AESCHLIMANN, D.; PAULSSON, M.; ROSA-PIMENTEL, R.; SOMMARIN, Y.; WENDEL.; OLDBERG, A.; HEINEGARD, D. Cartilage matrix proteins – An acid oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. **The Journal of Biological Chemistry,** vol. 267, n. 9, pp. 6132-6136, 1992.

HENDREN, L.; BEESON, P.. A review of the differences between normal and osteoarthritis articular cartilage in human knee and ankle joints. **The Foot**, vol. 19, pp. 171–176, 2009.

HOLMES, E.; TSANG, T.M.; HUANG, J.T.; LEWEKE, F.M.; KOETHE, D.; GERTH, C.W.; NOLDEN, B.M.; GROSS, S.; SCHREIBER, D.; NICHOLSON, J.K.; BAHN, S. Metabolic profiling of CSF: evidence that early intervention may impact on disease progression and outcome in schizophrenia. **Public Library of Science Medicine**, v. 3, 2006.

HOWELL, D. S.; TREADWELL, B. V.; TRIPPEL, S. B. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: MOSKOWITZ, R. W.; HOWELL, D. S.; GOLDBERG, V. M. **Osteoarthritis: diagnosis and medical/surgical management**. Filadélfia: W.B. Saunders 2 ed.; 1992. p.233-252.

HUANG, K.; WU, L. D. Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review. **Journal of International Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 1149-1160, 2008.

HÜGLE, T.; KOVACS, H.; HEIJNEN, I. A. F. M.; DAIKELER, T.; BAISCH, U.; HICKS, J. M.; VALDERRABANO, V. Synovial fluid metabolomics in different forms of arthritis assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 30, p. 1-6, 2012.

HURTIG, M. B.; POOL, R. R. Pathogenesis of equine osteochondrosis. In: McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 335-357.

JEFFCOT, L. B. Osteochondrosis - an international problem for the horse industry. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 16, n. 1, p. 33-37, 1996.

JENSEN, R.; PARK, R. D.; LAUERMAN, L. H.; BRADDY, P. M.; HORTON, D. P.; FLACK, D. E.; COX, M. F.; EINERTSON, N.; MILLER, G. K.; REHFELD, C. E. Osteochondrosis in feedlot cattle. **Veterinary Pathology**. v.18, p.529-535, 1981.

KANE, A. J.; McILWRAITH, C. W.; PARK, R. D.; RANTANEN, N. W.; MOREHEAD, J. P.; BRAMLAGE, L. R. The prevalence of radiographic changes in thoroughbred yearlings. In: 46th Annual Convention of the American Association of Equine Practioners, 2000, San Antonio, Texas – EUA, **Proceedings of the 46th AAEP Annual Convention**, v. 46, p. 365-369.

KATO, M.; ONODERA, T. Early changes of osteochondrosis in medial femoral condyles from rats. **Veterinary Pathology.** v 24:80-86, 1987.

KINOSHITA, Y.; YOKOTA, A. Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using *in vitro* proton magnetic resonance spectroscopy. **NMR in Biomedicine**, vol. 10, p. 2–12, 1997.

KNEELAND, B.J. Magnetic resonance imaging of articular cartilage and of cartilage degeneration. *In:* Stoller, D.W., Lippincott-Raven (ed.) ***Magnetic Resonance Imaging in Orthopaedics & Sports Medicine***, 1997, p. 83-91, Philadelphia.

KUETTNER, K. E. Biochemistry of Articular Cartilage in Health and Disease. **Clinical Biochemistry,** vol. 25, pp. 155-163, 1992.

LACITIGNOLA, L; CROVACE, A; FANIZZI, F.P; FRANCIOSO, E. H NMR investigation of normal and osteo-arthritic synovial fluid in the horse. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 21, p. 1-4, 2008.

LAMERS, R.J.; VAN NESSELROOIJ, JH.; KRAUS, V.B.; JORDAN, J.M.; RENNER, J.B.; DRAGOMIR, A.D. Identification of an urinary metabolite profile associated with osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, p. 762-768, 2005.

LAVERTY, S.; GIRARD, C. Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis. **The Veterinary Journal,** Vol 197, pp. 3-12, 2013.

LINKER, A.; MEYER, K. Production of unsaturated uronides by bacterial hyaluronidases. **Nature**, v. 174, n. 4443, p. 1192-1194, 1954.

LOHMANDER, S. Proteoglycans of joint cartilage: structure, function, turnover and role as markers of joint disease. Baillière's Clinical Rheumatology, v. 2, n. 1, p. 37-62, 1988.

LYKKJEN, S.; ROED, K.H.; DOLVIK, N.I. Osteochondrosis and osteochondral fragments in Standardbred trotters: prevalence and relationships. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, p. 332-33, 2012.

MACHADO, T. S. L.; SILVA, L. C. L. C.; MICHELACCI, Y. M. C.; BACCARIN, R. Y. A. Effects of arthroscopy upon synovial fluid biomarkers in equine joints with osteochondritis dissecans (OCD): preliminary results. In: World Veterinary Congress 31st, 2013, Praga, República Tcheca. **Proceedings of the 31st World Veterinary Congress**, ID 465. Disponível em: < http://worldvet.org/uploads/docs/wvc-2013-07-equine-medicine-posters-abstr.pdf> Acesso 25/10/2013.

MACHADO, T.S.L. Análise clinica e estrutural de processos de osteocondrite dissecante da articulação tibiotársica de equinos. **Tese (Doutorado em Ciências)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 138p., 2010.

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

MADSEN, R.K.; LUNDSTEDT, T.; GABRIELSSON, J.; SENNBRO, C.J.; ALENIUS, G.M.; MORITZ, T. Diagnostic properties of metabolic perturbations in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**. v. 13, p.1-9, 2011.

MAHER, A. D.; COLES, C.; WHITE, J.; BATEMAN, J. F.; FULLER, E. S.; BURKHARDT, D.; LITTLE,C. B.; CAKE, M.; READ, R.; MCDONAGH, M. B.; ROCHFORT, M. J.. 1H NMR Spectroscopy of Serum Reveals Unique Metabolic Fingerprints Associated with Subtypes of Surgically Induced Osteoarthritis in Sheep. **Journal of. Proteome Research.**,v. 11, p. 4261−4268, 2012.

MARTIN, J.A.; MARTINI, A.; MOLINARI, A.; MORGAN, W.; RAMALINGAM, W.; BUCKWALTER, J. A.; MCKINLEY, T. O. Mitochondrial Electron Transport and Glycolysis are coupled in Articular Cartilage. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 20, n. 4, p. 323–329, 2012.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica básica. São Paulo: Guanabara Koogan, 2007, 3 ed, 360p

McCAULEY, T.R.; DISLER, D.G. MRI of articular cartilage. **Radiology,** v. 209, p. 629-640,1998.

McCOY, A.M.; TOTH, F.; DOLVIK, N.I.; EKMAN, S.; ELLERMANN, J.; OLSTAD, K.; YTREHUS, B.; CARLSON, C.S. Articular osteochondrosis: a comparison of naturally-occurring human and animal disease. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, p.1638-1647, 2013.

McILWRAITH, C. W. Osteochondritis dissecans of the tibiotarsal (tarsocrural) joint. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 39, p. 69-72, 1993a.

McILWRAITH, C. W. What is developmental orthopedic disease, ostechondrosis, osteochondritis, metabolic bone disease. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 39, p. 35-44, 1993b.

McILWRAITH, C.W. Inferences from referred clinical cases of osteochondritis dissecans. **Equine Veterinary Journal,** v.16, p. 27-30, 1993c. **Suplemento**

McILWRAITH, C. W.; NIXON, A. J. Joint resurfacing: attempts at repairing articular cartilage defects. In: McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse.** Philadelphia: WB Saunders, 1996. p. 317-334.

McILWRAITH, C. W. Diseases of joints: developmental orthopedic disease and its manifestation in joint disease. In: STASHAK, T. S. **Adam's lameness in horses**. 5th ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 1998. p. 543-556.

McILWRAITH, C. W. Disease processes of synovial membrane, fibrous capsule, ligaments, and articular cartilage. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 47, p. 142-156, 2001.

McILWRAITH, C.W. Diseases of joint, tendons, ligaments, and related structures. In: STASHAK, T.S. **Adams´ Lameness in Horses.** Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, c. 7, 2002, p. 494-516.

McILWRAITH, C.W. From Arthroscopy to gene therapy—30 years of looking in joints. **Proceedings American Association of Equine Practitioners**, v. 51, p. 65-113, 2005a.

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

McILWRAITH, C.W. Surgical versus conservative management of osteochondrosis. **The Veterinary Journal**, v. 197, p.19-28, 2013.

McILWRAITH, C.W.; FOERNER, J.J.; DAVIS, D.M. Osteochondritis dissecans of the tarsocrural joint: results of treatment with arthroscopic surgery. **Equine Veterinary Journal,** v. 23, n. 3, p.155-162, 1991.

MESHITSUKA, S.; YAMAZAKI, E.; INOUE, M.; HAGINO, H.; TESHIMA, R.; YAMAMOTO, K. Nuclear magnetic resonance studies of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinica Chimica Acta.** v. 281, p.163–167, 1999.

MOYER, W. **A guide to equine joint injection.** Princeton: Solvay Veterinary, 1986. 32 p.

MUÑOZ, A.; RIBER, C.; SANTISTEBAN, R.; LUCAS, R.G.; CASTEJÓN, F. M. Effect of training duration and exercise on blood-borne substrates, plasma lactate and enzyme concentrations in Andalusian, Anglo-Arabian and Arabian breeds. **Equine Veterinay Journal.** v. 34, p.245-251, 2002. **Suplemento.**

NAKANO, T.; AHERNE, F. X. Involvement of trauma in the pathogenesis of osteochondritis dissecans in swine**. Canadian Jounal of Veterinary Research**, v. 52, p. 154-155, 1988.

NAUGHTON, D.; WHELAN, M.; SMITH, E.C.; WILLIAMS, R.; BLAKE, D.R; GROOTVELD, M. An investigation of the abnormal metabolic status of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis by high field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS Letters).** v.317, n.1/2, p.135-138, 1993.

NEGENDANK, W. Studies of human tumors by MRS: a review. NMR. **Biomedicine**, v. 5, p. 303–24, 1992.

NIXON, A. J.; FORTIER, L. A. New Horizons in Articular Cartilage Repair. In: 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practioners, 2001,San Diego, California – EUA, **Proceedings of the 47th AAEP Annual Convention,** v.. 47, p. 217-226

OLDBERG A.; ANTONSSON, O.; LINDBLOM, K.; HEINEGARD, D. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. The Journal of Biological Chemistry, vol. 267, n. 31, pp. 22346-22350, 1992.

PALMER, J. L.; BERTONE, A.L.; McCLAIN, H. Assesment of glycosaminoglycans concentration in equine synovial fluid as a marker of joint disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 205-212, 1995.

PARKE, H. G.; GROOTVELD, M. C.; HENDERSON, E. B.; FARRELLS, A.; DAVID R. BLAKE, D. R. Oxidative damage to synovial fluid from the inflamed rheumatoid joint detected by ‘H NMR spectroscopy **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis.** v 9, n. 1, p. 75-82, 1991.

PEREMANS, K.; VERSCHOOTEN, F. Results of conservative treatment of osteochondrosis of the tibiotarsal joint in the horse. J**ournal of Equine Veterinary Science,** v. 7, n. 6, p. 322-326, 1997.

PHILIPSSON, J. Pathogenesis of osteochondrosis – genetic implications. In: McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 359-362.

PHILIPSSON, J.; ANDREASSON, E.; SANDGREN, B.; DALIN, G.; CARLSTEN, J. Osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints in Standardbred trotters. II. Heritability. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, p. 38-41, 1993. Supplement.

PRIORI, R.; SCRIVO, R.; BRANDT, J.; VALERIO, M.; CASADEI, L. Metabolomics in rheumatic diseases: The potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis and treatment efficacy. **Autoimmunity Reviews,** v. 12, n. 10, p. 1022-30, 2013.

PURCELL, E. M.; TORREY, E. C.; POUND, R. V. Resonance absortion by magnetic moments in a solid. **Physical Review.** v. 69, p. 37-38, 1946.

PUTRI, S.; NAKAYAMA, Y.; MATSUDA, F.; UCHIKATA, T.; KOBAYASHI,S.; MATSUBARA, A.; FUKUSAKI, E. Current metabolomics: Practical applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 579-589, 2013.

QUINN, T. M.; GRODZINSKY, A. J.; BUSCHMANN, M. D.; KIM, Y. J.; HUNZIKER, E. B. Mechanical compression alters proteoglycan deposition and matrix deformation around individual cells in cartilage explants. **Journal of Cell Science**. v. 111, n. 5, p.573-583, 1998.

QUINN, T. M.; GRODZINSK, Y. A. J.; HUNZIKER, E. B.; SANDY, J. D. Effects of injurious compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 16, n. 4, p. 490-499, 1998.

RALPHS, S.C. Bilateral stifle osteochondritis dissecans in dogs and cats. **Journal of American Animal Hospital Association.** v 41, p.78-80, 2005.

RALSTON, S.L.; PELCZER, I.; SHATYNSKI, C.; SPEARS, P.F. NMR-based metabonomic analysis of serum from standardbred yearlings with or without hock osteochondrosis dessicans lesions: preliminary study. **Journal of Equine Veterinary Science,** v. 29, n. 5, p. 385-386, 2009.

RAY, C.S.; POOLE, A.R.; McILWRAITH, C.W. Use of synovial fluid and serum markers in articular disease. In: McILWRAITH, C.W. & TROTTER, G.W. **Joint Disease in the Horse.** W B Saunders, 1996, p. 203-216.

RELAVE, F.; MEULYZER, M.; ALEXANDER, K.; BEAUCHAMP, G.; MARCOUX, M. comparison of radiography and ultrasonography to detect osteochondrosis lesions in the tarsocrural joint: a prospective study. Equine Veterinary Journal, v. 41, n. 1, p. 34-40, 2009.

ROBERT, C.; VALETTE, J.P.; DENOIX, J.M. Correlation between routine radiographic findings and early racing career in French trotters. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, p. 473-478, 2006. Supplement.

RUGGERI, B.; SARKANS, U.; SCHUMANN, G.; PERSICO, A. Biomarkers in autism spectrum disorder: the old and the new. **Psychopharmacology**, doi:10.1007/s00213-013-3290-7. Disponível em:<http://www.researchgate.net/publication/257463252_Biomarkers_in_autism_spectrum_disorder_the_old_and_the_new> acesso 26/09/2013, 2013.

SANDERS, J.K.M.; HUNTER, B.K. Principles of nuclear magnetic resonance. In: SANDERS, J.K.M.; HUNTER, B.K. **Modern NMR Spectroscopy.** 2ª ed. Oxford University Press, 1993, p. 10-23.

SCHILLER, J.; ARNHOLD, J.; ARNOLD, K. NMR studies of the action of hypoclorous acid on native pig cartilage. **European Journal of Biochemistry,** v. 233, p. 672-676, 1995.

SCHILLER, J.; AMHOLD, J.; SONNTAG, K.; ARNOLD, K. NMR Studies on Human, Pathologically Changed Synovial Fluids: Role of Hypochlorous Acid. **MRM.** v.35, p.848-853, 1996.

SCHILLER, J.; NAJI, L.; HUSTER, D. KAUFMANN, J.; ARNOLD, K. 1H and 13C HR-MAS NMR investigations on native and enzymatically digested bovine nasal cartilage. **Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine**, vol.13, pp. 19-27, 2001.

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

SCHOFIELD, J. D.; FREEMAN, I. L.; JACKSON, D. S. The Isolation, and Amino Acid and Carbohydrate Composition, of Polymeric Collagens Prepared from Various Human Tissues. **Biochemical Journal.** v.124, p.467-473, 1971.

SERKOVA N.J.; SPRATLIN, J. L.; ECKHARDT, S.G. NMR-based metabolomics: translational application and treatment of cancer. **Current Opinion in Molecular Therapeutics,** v. 9, n. 6, p. 572-585, 2007.

SHOUGAARD, H.; RONNE, J. F.; PHILLIPSON, J. A radiographic survey of tibiotarsal osteochondrosis in a selected population of trotting horses in Denmark and its possible genetic significance. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 4, p. 288-289, 1990.

SIMKIN, P.; BASSETT, J. E.; Pathways of Microvascular Permeability in the synovium of normal and diseased human knees. **The Journal of Rheumatology**, vol. 38, n. 12, pp.2635-2642, 2011.

SINTZOFF, S.; SINTZOFF, J.R.; BLUM, A. Imagerie du cartilage: Etat actuel et perspectives. **Journal Radiologie**. v 80, p.677-678, 1999.

SMITH, G.; BERTONE, A. L.; KAEDING, C.; SIMMONS, E. J.; APOSTOLES, S. Anti-inflammatory effects of topically applied dimethyl sulfoxide gel on endotoxin-induced synovitis in horses. **American Journal of Veterinary Research.** v.59, n. 9, p. 1149-1152, 1998.

SOUSA, S.A. MAGALHÃES, A.; FERREIRA, M.M. Optimized bucketing for NMR spectra: three cases studies. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 122, p. 93-102, 2013.

TABASSI, N.C.; GARNERO, P. Monitoring cartilage turnover. **Current Rheumatology Reports,** v. 9, p.16-24, 2007.

TAPPREST, J.; AUDIGIÉ, F.; RADIER, C. Magnetic resonance imaging for the diagnosis of stress fractures in a horse. **Veterinary Radiology & Ultrasound,** v. 44, n. 4, p. 438- 442, 2003.

TODHUNTER, R.J. Anatomy and physiology of synovial joints. In: McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 1-28.

TORREGROSSA, L.; SHINTU, L.; CHANDRAN, J.; TINTARU, A.; UGOLINI, C.; MAGALHÃES, A.; BASOLO, F.; MICCOLI, P.; CALDARELLI, S. Toward the reliable diagnosis of indeterminate thyroid lesions: a HRMAS NMR-based metabolomics case of study. **Journal of Proteome Research,** v. 11, p. 3317-3325, 2012.

UCHIYAMA, H.; DOBASHI, Y.; OHKOUCHI, K.; NAGASAWA, K. Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 265, pp.7753-7759, 1990.

VAN DER WIETMARSCHEN, H.A; DAI, W; VAN DER KOOIJ, A.J; REIJMERS, T.H; SCHROEN, Y; WANG, M; XU, Z; WANG, X; KONG, H; XU, G; HANKEMEIER, T; MEULMAN, J.J; VAN DER GREEF, J. Characterization of rheumatoid arthritis subtypes using symptom profiles, clinical chemistry and metabolomics measurements. **PLoS ONE,** v. 7,n. 9, p. 1-8, 2012.

VAN WEEREN 2006. Etiology, Diagnosis, and Treatment of OC(D). Clinical Techniques in Equine Practice, v. 5, pp. 248-258, 2006.

VAN WEEREN, P.R. Osteochondrosis. In: AUER, J.A; STICK, J.A. **Equine Surgery**. 3ª ed., Saunders Company, 1996, p. 1166-1175.

VAN WEEREN, P.R.; BARNEVELD, A. Study design to evaluate the influence of exercise on the development of the musculoskeletal system of foals up to age 11 months. **Equine Veterinary Journal,** v. 31, p.4-8, 1999. Supplement.

VAN WEEREN, P. R; JEFFCOTT, L. B. Problems and pointers in osteochondrosis: Twenty years on. **The Veterinary Journal** v.197, p 96–102, 2013.

VERWILGHEN, D. R.; ENZERINKZ, E.; MARTENSX, A.; FRANCKK, T.; BALLIGANDY, M.; HENROTIN, T.; DETILLEUX, J.; SERTEYN, D. Relationship between arthroscopic joint evaluation and the levels of Coll2-1, Coll2-1NO2, and myeloperoxidase in the blood and synovial fluid of horses affected with osteochondrosis of the tarsocrural joint. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 19, pp. 1323-1329, 2011.

WALKER, J.B. Creatine: Biosynthesis, regulation, and function. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**. v. 50, p.177–252, 1979.

WILLIAMSON, M. P.; HUMM, G.; CRISP, A. J. ^{1}H nuclear magnetic resonance investigation of synovial fluid components in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and traumatic effusions. **British Journal of Rheumatology,** vol. 28, pp. 23-27, 1989.

WILSON, W.; VAN BURKEN, C.; VAN DONKELAAR, C.; BUMA, P.; VAN RIETBERGEN, B.; HUISKES, R. Causes of mechanically induced collagen damage in articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**. v.24, n. 2, p.220-228, 2006.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

YTREHUS, B.; CARLSON, C. S.; EKMAN, S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. **Veterinary Pathology,** v. 44, n. 4, p. 429-48, 2007.

YTREHUS, B.; EKMAN, S.; CARLSON, C. S.; TEIGE, J.; REINHOLT, F. P. Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. **Bone**, v. 35, p. 1294-1306, 2004.

ZHAI, G.; ESHGHI, E. A. Biomarkers for osteoarthritis: investigation, identification, and prognosis. **Current Biomarker Findings**, v. 2, p. 19-28, 2012.

ZHAI, G.; WANG-SATTLER, R.; HART, D.; ARDEN, N.; HAKIM, A.; ILLIG, T.; SPECTOR, T. Serum branched-chain amino acid to histidine ratio: a novel metabolomics biomarker of knee osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, p. 1227-1231, 2010.

ZHANG, A.; SUN, H.; QIU, S.; WANG, X. NMR-based metabolomics coupled with pattern recognition methods in biomarker discovery and disease diagnosis. Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrc.3985/abstract> Acesso 17/09/2013, 2013.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; HAN, Y.; WANG, X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 1079-1088, 2012.

APENDICE A - Numeração dos *buckets* e suas faixas em ppm nos espectros de RMN ^{1}H.

Nº	PPM	Nº	PPM	Nº	PPM	Nº	PPM	Nº	PPM
1	7,766-7,760	**40**	7,566-7,560	**79**	7,366-7,356	**118**	7,160-7,155	**157**	6,954-6,948
2	7,760-7,758	**41**	7,560-7,554	**80**	7,356-7,351	**119**	7,155-7,150	**158**	6,948-6,945
3	7,758-7,754	**42**	7,554-7,552	**81**	7,351-7,346	**120**	7,150-7,140	**159**	6,945-6,942
4	7,754-7,744	**43**	7,552-7,547	**82**	7,346-7,341	**121**	7,140-7,136	**160**	6,942-6,938
5	7,744-7,743	**44**	7,547-7,542	**83**	7,341-7,331	**122**	7,136-7,135	**161**	6,938-6,933
6	7,743-7,736	**45**	7,542-7,532	**84**	7,331-7,328	**123**	7,135-7,125	**162**	6,933-6,923
7	7,736-7,730	**46**	7,532-7,527	**85**	7,328-7,326	**124**	7,125-7,120	**163**	6,923-6,918
8	7,730-7,723	**47**	7,527-7,523	**86**	7,326-7,316	**125**	7,120-7,115	**164**	6,918-6,916
9	7,723-7,722	**48**	7,523-7,522	**87**	7,316-7,311	**126**	7,115-7,110	**165**	6,916-6,913
10	7,722-7,718	**49**	7,522-7,517	**88**	7,311-7,301	**127**	7,110-7,104	**166**	6,913-6,908
11	7,718-7,713	**50**	7,517-7,508	**89**	7,301-7,298	**128**	7,104-7,099	**167**	6,908-6,898
12	7,713-7,708	**51**	7,508-7,507	**90**	7,298-7,296	**129**	7,099-7,098	**168**	6,898-6,893
13	7,708-7,703	**52**	7,507-7,501	**91**	7,296-7,291	**130**	7,098-7,089	**169**	6,893-6,888
14	7,703-7,698	**53**	7,501-7,492	**92**	7,291-7,286	**131**	7,089-7,085	**170**	6,888-6,884
15	7,698-7,688	**54**	7,492-7,489	**93**	7,286-7,276	**132**	7,085-7,084	**171**	6,884-6,881
16	7,688-7,683	**55**	7,489-7,487	**94**	7,276-7,273	**133**	7,084-7,079	**172**	6,881-6,876
17	7,683-7,678	**56**	7,487-7,477	**95**	7,273-7,271	**134**	7,079-7,074	**173**	6,876-6,868
18	7,678-7,673	**57**	7,477-7,472	**96**	7,271-7,260	**135**	7,074-7,069	**174**	6,868-6,863
19	7,673-7,668	**58**	7,472-7,467	**97**	7,260-7,255	**136**	7,069-7,064	**175**	6,863-6,858
20	7,668-7,663	**59**	7,467-7,465	**98**	7,255-7,250	**137**	7,064-7,057	**176**	6,858-6,853
21	7,663-7,658	**60**	7,465-7,457	**99**	7,250-7,249	**138**	7,057-7,054	**177**	6,853-6,843
22	7,658-7,651	**61**	7,457-7,455	**100**	7,249-7,240	**139**	7,054-7,049	**178**	6,843-6,838
23	7,651-7,648	**62**	7,455-7,448	**101**	7,240 -7,238	**140**	7,049-7,039	**179**	6,838-6,838
24	7,648-7,638	**63**	7,448-7,442	**102**	7,238-7,235	**141**	7,039-7,034	**180**	6,838-6,828
25	7,638-7,637	**64**	7,442-7,432	**103**	7,235-7,230	**142**	7,034-7,033	**181**	6,828-6,823
26	7,637-7,632	**65**	7,432-7,427	**104**	7,230-7,223	**143**	7,033-7,029	**182**	6,823-6,818
27	7,632-7,623	**66**	7,427-7,421	**105**	7,223-7,220	**144**	7,029-7,019	**183**	6,818-6,813
28	7,623-7,623	**67**	7,421-7,417	**106**	7,220-7,215	**145**	7,019-7,015	**184**	6,813-6,812
29	7,623-7,613	**68**	7,417-7,416	**107**	7,215-7,208	**146**	7,015-7,014	**185**	6,812-6,804
30	7,613-7,608	**69**	7,416-7,408	**108**	7,208-7,203	**147**	7,014-7,004	**186**	6,804-6,801
31	7,608-7,607	**70**	7,408-7,406	**109**	7,203-7,195	**148**	7,004-6,999	**187**	6,801-6,794
32	7,607-7,599	**71**	7,406-7,401	**110**	7,195-7,193	**149**	6,999-6,994	**188**	6,794-6,793
33	7,599-7,598	**72**	7,401-7,396	**111**	7,193-7,189	**150**	6,994-6,984	**189**	6,793-6,787
34	7,598-7,591	**73**	7,396-7,386	**112**	7,189-7,185	**151**	6,984-6,979	**190**	6,787-6,777
35	7,591-7,586	**74**	7,386-7,384	**113**	7,185-7,180	**152**	6,979-6,976	**191**	6,777-6,774
36	7,586-7,578	**75**	7,384-7,381	**114**	7,180-7,174	**153**	6,976-6,969	**192**	6,774-6,772
37	7,578-7,577	**76**	7,381-7,371	**115**	7,174-7,170	**154**	6,969-6,964	**193**	6,772-6,764
38	7,577-7,567	**77**	7,371-7,368	**116**	7,170-7,165	**155**	6,964-6,959	**194**	6,764-6,760
39	7,567-7,566	**78**	7,368-7,366	**117**	7,165-7,160	**156**	6,959-6,954		