UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
VETERINÁRIA

**Estudo morfológico da cartilagem e osso subcondral dos
côndilos e crista sagital do osso terceiro metacarpiano de
equinos Puro-sangue-inglesês através de análise de imagem**

Marilia Ferrari Marsiglia

São Paulo

2019

MARILIA FERRARI MARSIGLIA

**Estudo morfológico da cartilagem e osso subcondral dos côndilos e crista
sagital do osso terceiro metacarpiano de equinos Puro-sangue-inglês através
de análise de imagem**

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

Departamento: Cirurgia

Área de concentração:
Clínica Cirúrgica Veterinária

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

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2019

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3867
FMVZ

Marsiglia, Marília Ferrari

Estudo morfológico da cartilagem e osso subcondral dos côndilos e crista sagital do osso terceiro metacarpiano de equinos Puro-sangue-ínglês através de análise de imagem. / Marília Ferrari Marsiglia. – 2019.

101 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

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

1. Equinos PSI de corrida. 2. Articulação metacarpofalangeana. 3. Tecido osteocondral.
4. Ultrassonografia. 5. Microtomografia. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Sandra Regina Toledo, CRB-8/8146, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo morfológico da cartilagem e osso subcondral dos côndilos e crista sagital do osso terceiro metacarpiano de equinos Puro-sangue-inglês através de análise de imagem", protocolada sob o CEUA nº 9971210617, sob a responsabilidade de **Luís Cláudio Lopes Correia da Silva e equipe; Marilia Ferrari Marsiglia** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/05/2018.

We certify that the proposal "Morphological study of cartilage and subchondral bone in condyles and sagittal ridge of the third metacarpal bone of Thoroughbred horses through analysis of image", utilizing 10 Equines (males and females), protocol number CEUA 9971210617, under the responsibility of **Luís Cláudio Lopes Correia da Silva and team; Marilia Ferrari Marsiglia** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/23/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2017** a **06/2019**

Área: **Clínica Cirúrgica Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Equídeos** sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **3 a 6 anos** N: **10**

Linhagem: **Puro-Sangue-Inglês**

Peso: **400 a 550 kg**

Local do experimento: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP)

São Paulo, 30 de julho de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARSIGLIA, Marilia Ferrari

Título: Estudo morfológico da cartilagem e osso subcondral dos côndilos e crista sagital do osso terceiro metacarpiano de equinos Puro-sangue-inglês através de análise de imagem

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: _____

Dedico este estudo aos que me inspiraram a realizar esse trabalho, aos mestres em ciências que são exemplos para o mundo e ultrapassam gerações. Dedico ao Leonardo da Vinci, ao Darwin, ao Galileu Galilei, ao Isaac Newton, à Marie Curie, dentre muitos outros que me aguçaram o interesse e a curiosidade nessa arte de ciências.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Armando Marsiglia e Maria das Graças Ferrari, por me proporcionarem a oportunidade de atingir esta formação, bem como todo o apoio incondicional nessa e em todas as decisões ao longo do meu percurso acadêmico.

Ao meu irmão Rafael Ferrari Marsiglia que sempre foi um exemplo de força e determinação o qual almejo para minha vida. Um grande exemplo de profissional. Meu grande companheiro, e que teve papel importante ao longo dessa jornada.

À minha prima Mariana Loprete Marsiglia, que também é praticamente uma irmã por crescermos juntas tal qual, sempre pronta a me apoiar. Ao meu tio Marcos que com seu jeito peculiar de ser está sempre por mim e por todos.

Aos meus avós, minha avó Stella Mori Marsiglia, que mesmo sem entender exatamente o que foi minha pós-graduação sempre me ajudou na rotina e aturou meu mau-humor diário, sem ela tudo seria muito mais difícil; à minha avó Rita Borges Ferrari e meu avô Francisco Marsiglia (*in memoriam*) que sei que torceram por mim onde quer que estejam pois quando pensava em desistir, sentia uma força a me empurrar para frente.

Ao meu orientador Prof^o Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, a quem tenho profunda admiração, que foi muitas vezes como um pai, desde puxões de orelha a brincadeiras e risadas. Agradeço por todos ensinamentos ao longo desses muitos anos, aproximadamente oito anos de convivência e parceria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha fiel escudeira Dra Ana Lúcia Miluzzi Yamada, que esteve sempre ao meu lado para todo e qualquer parada, boa ou ruim, sempre pronta pra me ajudar e ouvir minhas lamentações da vida.

Ao meu parça Rodrigo Tavares Neiman, que foi minha ponte com o Jockey desde o começo do projeto, que foi grande amigo e me ensinou muito sobre os cavalos de corrida.

Aos meus amigos da pós-graduação com quem compartilhei risadas e dificuldades, Geissiane M. Marcondes, Nicole F. Paretsis, Sarah R. T. Seidel, Raquel R. Bellomo, Júlio Spagnolo, Ana Flávia Sanchez, Fernanda Agreste, Eric D. Pauls Sotelo, Cynthia P.

Vendruscolo, Fernando M. Jaramillo, Joice Fülber, Paulo Bogossian, Aline de Matos, Nubia Rodrigues, Miriam Zibordi.

Aos colaboradores e avaliadores diretos desse projeto Marcelo Pinheiro, Stefano C. F. Hagen e Jamille Garcia.

Aos meus amigos que seguiram ao meu lado desde a residência e tiveram as mesmas angústias compartilhadas, Roberto R. Rosa, Viviane Codognoto, Paula Barreto.

Aos residentes de 2017 a 2019 que me ajudaram na logística do descongelamento do meu material no período noturno: o meu muito obrigada.

Aos meus queridos estagiários que se tornaram residentes e pude ver o crescimento ao meu lado, sempre crescendo juntos, Cauê Natan, Tatiana Yumi, Paula Tokawa, Sofia Cicolo, Carolina Pellegrini, Anderson Souza, Alessandra Cechim.

Aos amigos da graduação que foram imprescindíveis também ao longo da pós-graduação, seja pela amizade nos tempos difíceis quanto pela participação neste trabalho, Daniel Magalhães Lima, Jéssica Reple, Julia Rizzo.

Ao Jockey Club de São Paulo por disponibilizar o material necessário para a confecção desse estudo, em especial ao colega veterinário Luís Renato Oselleiro.

À técnica de laboratório do instituto de Biociências da USP, Simone Ferreira pelo apoio, obtenção das imagens de microtomografia e pela base dos estudos sobre esse exame de imagem, até então um mistério para mim.

Agradeço imensamente ao enfermeiro da cirurgia Cícero Antônio da Silva que foi parceiro em todas as horas, desde a conservação das peças na câmara fria até os cortes de biopsia. Um grande parceiro e amigo desde minha graduação e que levarei sempre comigo.

À Prof^a Lilian de Sá por toda paciência com minhas aflições histopatológicas e por estar sempre pronta pra me ajudar, mesmo com sua falta de tempo. À ela, minha admiração de longa data pela pessoa incrível que é.

Ao enfermeiro Marquinhos Alves por estar sempre pronto a ajudar e conversar sobre plantinhas.

Aos funcionários Mauro Mattos e Cláudio Arroyo do laboratório de Histopatologia do VPT por me ajudarem em toda execução da parte histológica do projeto.

À secretária do VCI Livia dos Santos Gimenes por me ajudar em todos os momentos do mestrado, sempre respondendo as minhas milhões de dúvidas com bom humor e paciência.

Aos professores da FMVZ-USP que ajudaram na minha formação pessoal e profissional, em especial aos do VRA por quem tenho imenso carinho, e aos da área de equinos Prof^o André Luis do Valle De Zoppa, Prof^o Rodrigo Romero Corrêa, Prof^a Carla Bargi Belli, Prof^o Wilson Fernandes, Prof^a Raquel Yvonne Arantes Baccarin pelos conhecimentos compartilhados.

Aos equinos (*in memoriam*) que participaram desse estudo e fizeram tudo isso ser possível.

*Não acredito que você tenha que ser melhor que todos os outros. Acredito
que você tenha que ser melhor do que achou que poderia ser.”*

Ken Venturi

RESUMO

MARSIGLIA, M. F. **Estudo morfológico da cartilagem e osso subcondral dos côndilos e crista sagital do osso terceiro metacarpiano de equinos Puro-sangue-inglês através de análise de imagem** [Morphological study of cartilage and subchondral bone in condyles and sagittal ridge of the third metacarpal bone of Thoroughbred horses through analysis of image]. 2019. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As afecções articulares têm papel preponderante frente às claudicações nos equinos atletas, sendo a articulação metacarpofalangeana (MCF) uma das mais frequentemente afetadas. Isso se deve à sua configuração anatômica e maior amplitude de movimentos, apresentando hiperextensão durante a fase de apoio dos membros ao solo. As articulações apresentam variações na densidade e espessura do osso subcondral e cartilagem ao longo de sua superfície e, conseqüentemente, variações nas propriedades mecânicas e estruturais. Métodos de imagem, como a radiografia, ultrassonografia e tomografia computadorizada, têm sido empregados e correlacionados com a finalidade de delinear essas variações, além de diagnosticar afecções que acometem o sistema articular de equinos. O objetivo desse projeto foi avaliar o tecido osteocondral da articulação MCF de peças anatômicas de equinos da raça Puro-sangue-inglês de corrida, que estavam em treinamento, através de análise de imagem. Foram utilizados oito pares de membros torácicos de equinos em constante e semelhante padrão de treinamento esportivo, com idade entre dois e cinco anos, os quais foram a óbito por motivos não relacionados à articulação MCF. Os membros foram armazenados congelados e, após descongelamento, submetidos a avaliação macroscópica, exames radiográficos e ultrassonográficos, e avaliação microscópica, por microtomografia e histologia. A partir dessas análises foi possível adquirir informações morfológicas dessas articulações de equinos de corrida. A espessura média da cartilagem medida por ultrassonografia, para côndilo lateral, crista sagital e côndilo medial foi de 0,81; 0,76; 0,75 mm, respectivamente. Para o mesmo parâmetro, medido em software CTAn®, a média das espessuras foi igual para ambos os côndilos de 0,178 mm e de 0,152 mm para a crista sagital. A média dos valores de Densidade Óptica Radiográfica (DOR), para cada região foi de 9,20 para crista sagital, 9,87 para o côndilo lateral e 10,04 para côndilo medial em graus da escala de alumínio. Já na Densidade Mineral Óssea (DMO), avaliado por micro-TC, foi de 0,515 para crista sagital, 0,569 para côndilo lateral e 0,579 para côndilo medial. Quando comparados os valores de DOR e DMO, a crista sagital foi o valor mais baixo em 75% dos animais. Analisando as imagens de microtomografia, 50% dos animais

tiveram espessura trabecular maiores no côndilo lateral. Comparando-se entre si os exames de imagem, notou-se que o exame ultrassonográfico é o que mais se relaciona com o histológico ($p=0,288$) em questão de sensibilidade do exame, e os que mais diferiram entre os avaliadores foi o de exame macroscópico e radiográfico. Além disso, os escores foram mais homogêneos na macroscopia e no ultrassom. Para o exame histológico foi utilizado duas colorações: H&E e Azul de Toluidina, sendo que na avaliação de densidade óptica integrada para o Azul de Toluidina, a média dos valores foi maior na crista sagital de 572,4% e semelhante nos côndilos, sendo 481,6% o lateral e 469,4% o medial. Ao final, foi possível observar a ocorrência de lesões em superfície articular que se distribuem de maneira bastante semelhante e, embora haja alguma variação, não houve diferença estatística entre os escores dos animais. Segundo os parâmetros avaliados nesse projeto, concluiu-se que não houve diferença estatística quanto ao local de coleta da amostra no osso metacarpiano e pouca variação entre um membro e outro. Todos os equinos avaliados nesse projeto apresentaram algum comprometimento de superfície articular de terceiro metacarpiano, mas mesmo assim foi possível determinar características morfológicas utilizando técnicas de imagem descritas acima.

Palavras-chave: Equinos PSI de corrida. Articulação metacarpofalangeana. Microtomografia. Ultrassonografia. Tecido osteocondral.

ABSTRACT

MARSIGLIA, M. F. Morphological study of cartilage and subchondral bone in condyles and sagittal ridge of the third metacarpal bone of Thoroughbred horses through analysis of image. [Estudo morfológico da cartilagem e osso subcondral dos côndilos e crista sagital do osso terceiro metacarpiano de equinos Puro-sangue-inglês através de análise de imagem]. 2019. 101 f. Dissertation (Masters of Science) – Veterinary Medicine School, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Joint diseases in horses have a predominant role in lameness, being the metacarpophalangeal (MCP) joint one of the most frequently affected. MCP joint has the highest number of site-specific traumatic and degenerative lesions when compared to other joints. This is due to its anatomical configuration and, among all of the locomotor system of horses, it is the one with the greatest range of motion, presenting hyperextension during the support phase of the limbs. All joints show a variation in the density and thickness of the subchondral bone along its surface and, consequently, variation in the mechanical properties at each site. Many imaging methods have been employed and correlated in order to delineate this difference and diagnose the diseases affecting the joints of the horses. The objective of this project was to evaluate the osteochondral tissue of the MCP joints of anatomical parts of Thoroughbred racehorses, through methods of macroscopic imaging such as radiography and ultrasonography, and microscopes such as optical microscopy and micro tomography, searching for the identification and characterization of these tissues. Eight pairs of forelimbs were used, collected from horses with constant and similar training programme, aged between 3 and 5 years old, who died for reasons not related to the MCP joints. Each method were analyzed individually, characterizing the patterns and morphology of cartilage and subchondral bone. From these analyzes, it was possible to acquire morphological information on these racing horse joints. The mean cartilage thickness measured by ultrasound, for the lateral condyle, sagittal ridge and medial condyle was 0.81; 0.76; 0.75 mm, respectively. For the same parameter, measured in CTAn® software, the average thickness was equal for both condyles of 0.178 mm and 0.152 mm for the sagittal ridge. The average of the Radiographic Optical Density (ROD) values for each region was 9.20 for the sagittal ridge, 9.87 for the lateral condyle and 10.04 for the medial condyle using the aluminum scale. In the Bone Mineral Density (BMD), assessed by micro-CT, it was 0.515 for sagittal ridge, 0.569 for lateral condyle and 0.579 for medial condyle. When comparing the values of ROD and BMD, the sagittal ridge was the lowest value in 75% of the animals. Analyzing the microtomography images, 50% of the animals had greater

trabecular thickness in the lateral condyle. Comparing each imaging exams, it was noted that the ultrasound exam is the one that most closely relates to the histological exam ($p = 0.288$) in terms of sensitivity, and the ones that most differed between the evaluators was the macroscopic and radiographic exam. In addition, the scores were more homogeneous in macroscopy and ultrasound. For the histological examination, two stains were used, in the evaluation of integrated optical density for Toluidine Blue, the mean values were higher in the sagittal ridge of 572.4% and similar in the condyles, with 481.6% being the lateral and 469.4% the medial. At the end, it was possible to observe the occurrence of lesions on the articular surface that are distributed in a very similar way and, although there is some variation, there was no statistical difference between the animal scores. According to the parameters evaluated in this project, it was concluded that there was no statistical difference regarding the sample collection site in the metacarpal bone and little variation between one limb and another. All horses evaluated in this project had some third metacarpal joint surface compromise, but it was still possible to determine morphological characteristics using imaging techniques described above.

Key-words: Thoroughbred racehorses. Metacarpophalangeal joint. Microtomography. Ultrasound. Osteochondral tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Imagem durante realização do exame radiográfico, com destaque para o membro fixado em suporte de madeira mimetizando a posição natural de apoio.....14
- Figura 2** - Imagem demonstrando os locais de realização de biopsias osteocondrais na face articular do terceiro metacarpiano (*xis* preto).....15
- Figura 3** - (A) Dispositivo utilizado para retirada das biopsias ósseas, com bordo circular cortante em sua extremidade; (B) Coleta dos fragmentos ósseos, em destaque para a crista sagital na imagem.....15
- Figura 4** - Avaliação e mensuração de densidade óssea no *software* ImageJ. Radiografia dorsopalmar com ROI em côndilos e crista sagital (círculos azuis), escala de alumínio para padronização dos valores (retângulo amarelo). Ao lado, janela do programa com os valores obtidos para cada degrau e cada região de interesse (ROI), sendo os três primeiros os ROI seguidos dos valores dos degraus.....21
- Figura 5** - (A) Detalhe à esquerda do fragmento biopsiado (Ø 50 mm e 60 mm comprimento). À direita, tubo Falcon de 15ml preenchido com paraformaldeído 4% e amostras dispostas separadamente por borracha preta EVA 3 mm; (B) Fragmento retirado de crista sagital antes de ser colocado no tubo.....23
- Figura 6** - (A) Articulação MCF seccionada e aparente superfície articular do osso terceiro metacarpiano; revelando lesões em linha de desgaste nos côndilos do metacarpiano; (B) e detalhe de artrose palmar com descoloração púrpura em côndilo medial, no espaço onde foi removido o fragmento para avaliação nota-se o adelgaçamento da cartilagem hialina *M: côndilo medial*.....41
- Figura 7** - Interface do software CTAn evidenciando como foi realizada a mensuração do meio do fragmento (retângulo azul). As setas laranjas mostram que cada metade do fragmento está para cada lado no tubo Falcon.....42
- Figura 8** - Software CTAn no modo Color 2 (círculo vermelho a direita) para destacar e evidenciar a cartilagem articular do fragmento (círculo branco na tela) pra posterior mensuração da espessura.....42
- Figura 9** - Microfotografia da lâmina corada com Azul de Toluidina, evidenciando as regiões da cartilagem com proteoglicanos que absorveram o corante (gradiente de azul). A região inferior é o osso subcondral que não cora com esse pigmento57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos animais utilizados durante o estudo, relacionando idade, sexo, número de apresentações e a <i>causa mortis</i> (fornecidos por Jockey Club, 2018).....	13
Tabela 2 - Valores de espessura cartilaginosa da face articular do terceiro metacarpiano, dos membros torácicos direito e esquerdo, mensurados por ultrassonografia	34
Tabela 3 - Valores de DOR mensurados em cada região do terceiro metacarpiano, demonstrado nos degraus da escala de Alumínio.....	38
Tabela 4 - Valores numéricos obtidos a partir do CTAn para cada região avaliada do terceiro metacarpiano, abrangendo comprimento da biopsia óssea e espessura da sua cartilagem.....	43
Tabela 5 - Valores numéricos obtidos a partir do CTAn para cada região avaliada do terceiro metacarpiano, abordando densidade mineral óssea, Hounsfield, razão entre área óssea da amostra e total (BAr/TAr), separação (Tb.Sp) e número de trabéculas ósseas (Tb.Th) e número de trabéculas por mm de tecido (Tb.N). Voxels é a quantidade de cortes feitos e reconstruídos pelo <i>software</i>	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico de escores atribuídos a cada membro, por cada avaliador, ao exame ultrassonográfico.....	32
Gráfico 2 - Gráfico de escores atribuídos a cada membro, por cada avaliador, ao exame radiográfico.....	36
Gráfico 3 - Dispersão das pontuações da avaliação macroscópica das articulações MCF, pelos diferentes avaliadores.....	40
Gráfico 4 - Dispersão dos valores de densidade mineral óssea, dos articulações MCF direita e esquerda, em suas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral).....	48
Gráfico 5 - Dispersão dos valores de Unidades de Hounsfield (HU) da microtomografia, para as articulações MCF nas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral).....	49
Gráfico 6 - Dispersão dos valores de BAr/TAr, razão entre a área óssea do fragmento (BAr) sobre a área total (TAr) da microtomografia, das articulações MCF em suas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral).....	50
Gráfico 7 - Dispersão dos valores de separação trabecular (Tb.Sp) da microtomografia, para as articulações MCF nas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral).....	50
Gráfico 8 - Dispersão dos valores de espessura de trabéculas ósseas (Tb.Th) da microtomografia, para as articulações MCF nas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral).....	51
Gráfico 9 - Dispersão dos valores de número de trabéculas ósseas por mm de tecido (Tb.N) da microtomografia, para as articulações MCF nas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral).....	51
Gráfico 10 - Dispersão dos escores obtidos de cada articulação MCF do equinos, por cada avaliador.....	52
Gráfico 11 - Comportamento dos valores de Densidade Óptica Integrada em relação às regiões do terceiro metacarpiano, entre os animais.....	58

Gráfico 12 - Médias dos valores de DOI para cada região do metacarpiano para o membro torácico direito, segundo a coloração de Azul de Toluidina.....	58
Gráfico 13 - Médias dos valores de DOI para cada região do metacarpiano para o membro torácico esquerdo, segundo a coloração de Azul de Toluidina.....	59
Gráfico 14 - Média geral dos valores de DOI diferenciados por região avaliada do terceiro metacarpiano.....	60
Gráfico 15 - Boxplot de comparação entre os escores nos diferentes locais de lesão e os escores atribuídos a esses locais.....	61
Gráfico 16 - Boxplot de comparação entre os escores nos diferentes locais de lesão, nos diferentes animais.....	61
Gráfico 17 - Boxplot comparando os diferentes exames pela visão dos diferentes avaliadores.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros avaliados através do exame ultrassonográfico.....	16
Quadro 2 - Parâmetros avaliados ao exame radiográfico, adaptado.....	18
Quadro 3 - Estágios e escores macroscópico para descrever lesões visíveis nos côndilos do terceiro metacarpiano.....	22
Quadro 4 - Valores padrões de DMO e HU adotados por esses autores e utilizados como base no presente trabalho.....	24
Quadro 5 - Sistema de pontuação histológica referente à cartilagem articular – modificado.....	26
Quadro 6 - Sistema de pontuação histológica referente ao osso subcondral.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
IB	Instituto de Biociências
MCF	Articulação Metacarpofalangeana
Mc3	Terceiro metacarpiano
PSI	Equinos Puro-sangue-inglês
OSC	Ossó subcondral
CM	Côndilo medial
CS	Crista Sagital
CL	Côndilo Lateral
DMO	Densidade mineral óssea
DOR	Densitometria ótica radiográfica
DOI	Densidade Óptica Integrada
HU	Hounsfield Unidades
kV	Quilovolts
mAs	Miliampère-segundo
mmAl	Milímetros de Alumínio
TC	Tomografia Computadorizada
Micro-TC	Microtomografia computadorizada
ROI	Região de interesse
VOI	Volume de interesse
BAr/TAr	Porcentagem de área óssea
Tb.Sp	Espessura trabecular
Tb.N	Número de trabéculas por mm de tecido ósseo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μA	Microamperes
μTC	Microtomografia computadorizada
μm	Micrômetro
Ø	Diâmetro
mm	Milímetro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1. ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA (MCF)	24
2.2. CARTILAGEM ARTICULAR.....	25
2.3. OSSO SUBCONDRA L	27
2.4. MÉTODOS DE EXAMES DE IMAGEM.....	29
2.5. ANÁLISES MICROSCÓPICAS	32
3. OBJETIVO	34
4. MATERIAL E MÉTODO	34
4.1. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	38
4.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA.....	39
4.3. DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA.....	41
4.4. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	43
4.5. MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (Micro-TC).....	44
4.6. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	46
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5. RESULTADOS	52
5.1. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	53
5.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E DENSITOMETRIA ÓPTICA.....	57
5.3. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	61
5.4. MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (Micro-TC).....	63
5.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	73
5.5.1. HEMATOXILINA & EOSINA	73
5.5.2. AZUL DE TOLUIDINA.....	78
5.6. OCORRÊNCIA DE LESÕES.....	81
6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	92

1. INTRODUÇÃO

Dentre as causas mais frequentes de claudicação em equinos, as que afetam as articulações são: osteocondrose, osteocondrite dissecante (OCD), fraturas intra-articulares, osteoartrite, sinovite, capsulite, luxações e fragmentação de meniscos (CARMONA; PRADES, 2009).

Cavalos de corrida têm alta incidência de lesões envolvendo as superfícies palmarodistais de articulações com elevada amplitude de movimentação (POOL; MEAGHER, 1990) e, dentre as mais acometidas está a metacarpofalangeana (MCF). Essa articulação, durante a hiperextensão, que ocorre na fase de apoio em altas velocidades nas corridas, apresenta impacto do aspecto dorsoproximal da primeira falange contra a margem dorsodistal do metacarpiano principal, levando a um pico de carga intermitente (PALMER et al., 1996). Traumas na articulação MCF estão entre as principais causas de claudicação em animais de corrida, sendo um fator importante para perdas econômicas.

A articulação MCF é formada pelos ossos terceiro metacarpiano e falange proximal, juntamente com os dois sesamóides proximais palmares, com superfícies articulares de encaixe justo, que podem rapidamente desenvolver erosões lineares e linhas de desgaste associadas à fragmentação osteocondral (McILWRAITH et al., 2010). Apresenta uma cápsula fibrosa contribuindo para estabilidade, além dos ligamentos suspensório (LS), intersesamoideo (LI), e ligamentos colaterais (LC) medial e lateral. Possui também um recesso proximal dorsal, que contém líquido sinovial e outro recesso proximal palmar com vilosidades sinoviais (DENOIX; AGRÉGE, 2001; MACHADO et al., 2016). Na face palmar da MCF há o ligamento anular palmar, localizado imediatamente abaixo da pele e tecido subcutâneo. Os bordos do tendão flexor digital superficial (TFDS) estão em estreito contato com o tendão flexor digital profundo (TFDP). Recobrimo a superfície óssea está a cartilagem articular (REEF; WHITTIER; ALLAM, 2005; SEIGNOUR et al., 2012).

A cartilagem articular é estruturalmente organizada em três zonas distintas: Zona superficial, que é uma camada relativamente fina com feixes de colágeno orientados horizontalmente e com condrócitos levemente achatados; a Zona média, que é mais espessa e contém condrócitos arredondados e feixes de colágeno com orientação heterogênea; e a Zona profunda, que geralmente representa mais da metade da espessura da cartilagem articular em animais grandes e humanos esqueleticamente maduros,

contendo condrócitos maiores e fibras de colágeno orientadas perpendicularmente à superfície, que também estão ancoradas na cartilagem calcificada abaixo. A *tidemark* é uma linha mineralizada que demarca a interface de cartilagem calcificada e não calcificada (HOEMANN et al., 2011).

Para avaliar as estruturas do esqueleto axial, o uso dos exames de imagem é de grande importância como auxílio diagnóstico na medicina equina. Grande parte desses recursos estão disponíveis, elevando a qualidade do atendimento aos equinos de esporte. A obtenção de imagens pode ser não invasiva com o uso da radiografia, ultrassonografia, ressonância magnética e tomografia computadorizada (SOUZA et al., 2005; WHITCOMB, 2005; BAGI et al., 2006; DRUM et al., 2009; GONZALEZ et al., 2010; DYSON, 2011; SEIGNOUR et al., 2012), ou invasiva com biopsia para histologia e artroscopia (BOURÉ et al., 2002; NIXON et al., 2004; STORY; BRAMLAGE, 2004; OLIVE et al., 2009; JUNIOR et al., 2016). A ultrassonografia, assim como a radiografia, é um método diagnóstico de rotina do médico veterinário de equinos, e tem grande relevância clínica (REEF; WHITTIER; ALLAM, 2005; SARIN et al., 2017).

Para a análise da arquitetura de osso trabecular e cortical, a histologia foi por muito tempo a técnica qualitativa de eleição (BOUXSEIN et al., 2010). Além disso, a coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) permite a avaliação da matriz extracelular, da morfologia celular e da interface osso-cartilagem. Apesar das análises histológicas promoverem informações únicas na celularidade e de remodelamento ósseo, existem limitações em relação ao acesso da microarquitetura óssea (McILWRAITH et al., 2010; FINNILÄ et al., 2017).

Para análises mais detalhadas, tem aumentado constantemente o uso da microtomografia computadorizada de alta resolução, para obtenção de imagens de osso trabecular e cortical em espécies animais e humanos (OLIVE et al., 2009; BOUXSEIN et al., 2010; WHITTON et al., 2010; TROPE et al., 2015; MACHADO et al., 2016; WILLIAMSON et al., 2018). O método de microtomografia computadorizada é capaz de diferenciar tecidos moles e mostra alto contraste entre as estruturas calcificadas (NEVES, 2010).

Para que se estude as alterações teciduais articulares, tanto decorrentes do treinamento esportivo como de afecções adquiridas, é fundamental o profundo conhecimento morfológico em suas diferentes formas, uma vez que para cada raça, idade e tipo de atividade haverá particularidade. Além disso, o tempo desde a adaptação ao

treinamento até a fase de platô e a carga necessária para estimular essa adaptação ainda são desconhecidos (MARTIG et al., 2018).

2. REVISÃO DE LITERATURA

O material apresentado a seguir referencia pesquisas atuais e relevantes da literatura sobre articulação metacarpofalangeana, cartilagem articular, tecido osteocondral e métodos de imagem em cavalos de corrida.

2.1. ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA (MCF)

A articulação MCF é um gínglimo, que preferencialmente se movimenta em posição de flexão, sendo os movimentos de lateralidade restritos por ligamentos colaterais e tecidos adjacentes. As cápsulas articulares projetam-se nas faces dorsal e palmar formando recessos (KÖNIG; LIEBICH, 2002). A cápsula articular em geral mede aproximadamente 1,0 mm em sua origem proximal e 0,5 mm na inserção distal, em animais sadios. O aspecto dorsal da superfície articular pode ser identificada com o membro na posição vertical, apoiado sobre o solo (DENOIX; AGRÉGE, 2001a; SEIGNOUR et al., 2012).

As articulações MCFs suportam uma carga biomecânica significativa durante o movimento e, portanto, são muito suscetíveis ao desenvolvimento de lesões degenerativas crônicas. Em um estudo enumerando as principais lesões musculoesqueléticas de cavalos de corrida, no período de 14 anos, as lesões na região metacarpal corresponderam a 53% dentre todas (STOVER; MURRAY, 2008).

Adicionalmente, a mesma representa o maior número de lesões traumáticas e degenerativas sítio-específicas, quando comparada com outras articulações do esqueleto apendicular (POOL, 1996), ocorrendo uma maior incidência de lesões nos membros torácicos quando comparados com os membros pélvicos, sendo importante o fato dos torácicos receberem em média 60 a 65% do peso corpóreo e são submetidos a taxas de carga mais altas do que os membros pélvicos (DENOIX et al., 1996; McDUFFEE; STOVER; COLEMAN, 2000; STASHAK. T. S., 2002).

Forças mecânicas excessivas aplicadas a uma articulação podem resultar em doenças articulares degenerativas. Em atletas humanos de corrida, condições como

obesidade e desalinhamento articular contribuem para a sobrecarga articular. Entretanto, em atletas equinos de corrida, fraturas dos ossos do carpo e metacarpiano principal estão entre as causas mais prevalentes de lesões de término de carreira esportiva ou eutanásia. Formas leves de artrose por sobrecarga da MCF são comuns e podem se confundir com artroses ocasionadas pelo exercício (NORRDIN; KAWCAK; WAYNE McILWRAITH, 1998).

2.2.CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular é um tecido avascular e sem terminações nervosas. É composta por condrócitos e matriz extracelular, organizados em várias camadas, se tornando hipertrófica e mineralizada quando próxima ao osso subcondral. Estruturalmente é organizada em 3 zonas distintas, sendo a superficial uma camada relativamente fina com feixes de colágeno horizontalmente orientados e condrócitos achatados; a intermediária é mais espessa e contém condrócitos arredondados e feixes de colágeno com orientação heterogênea; e por fim, a zona profunda, que geralmente representa mais da metade da espessura da cartilagem articular em grandes animais e seres humanos esqueleticamente maduros (HOEMANN et al., 2011). A matriz extracelular corresponde de 20 a 30% da estrutura, sendo esta constituída por proteoglicanos, glicoproteínas, e colágeno e por 60 a 70% de água intersticial (SCHLUETER ORTH, 2004). O colágeno tipo II corresponde a 95% do colágeno total e é encontrado em fibrilas formando ligações cruzadas em rede tridimensional. A concentração da matriz extracelular eleva-se nas camadas mais profundas da cartilagem, o que proporciona forma e rigidez, dando força de tração ao tecido (SCHLUETER; ORTH, 2004). É o equilíbrio entre a tensão na rede de colágeno e a pressão osmótica dos proteoglicanos que fornece à cartilagem articular sua combinação única de rigidez e resiliência e, portanto, fornece as características biomecânicas específicas essenciais para a função articular fisiológica (VELOSA; TEODORO; YOSHINARI, 2003). Os proteoglicanos são essenciais para a proteção da cartilagem contra a sobrecarga e queda da pressão osmótica, se apresentando inertes no líquido sinovial para ajudar na lubrificação da articulação (MAJNO; JORIS, 2004; ZACHARY; McGAVIN, 2013).

Todas articulações mostram uma variação na densidade e espessura de cartilagem e osso subcondral ao longo de sua superfície, consequentemente apresentando variação em suas propriedades mecânicas (ECKSTEIN et al., 1995).

Fibrilação e falhas nas interações entre pontes de colágeno podem ser resultantes de sobrecargas nas articulações ou decorrentes de traumas durante o exercício físico, podendo levar à esclerose óssea subcondral e remodelação articular. Isso resulta na diminuição da capacidade do osso subcondral de absorver impacto, que por sua vez aumenta tensão e favorece alterações articulares (RADIN et al., 1991). A fibrilação cartilaginosa representa a perda progressiva das camadas da cartilagem, podendo chegar à eburnação e a consequente exposição do osso subcondral (BASTIANI et al., 2014).

A cartilagem hialina é normalmente um material de coloração branca a branca-azulada, com uma superfície lisa e úmida (ZACHARY; McGAVIN, 2013). Quando alterada pode apresentar descoloração azul, observada macroscopicamente, como reflexo de hiperemia óssea subcondral e/ou hemorragia. A lesão óssea subcondral na região palmar dos côndilos metacarpianos pode levar ao colapso da cartilagem articular sobrejacente, e com isso facilitar a fratura condilar, tão comumente observada em equinos de corrida (DIAB et al., 2017).

Um estudo realizado por Brama *et al.* (2000) demonstrou que existem variações significativas nas propriedades bioquímicas das superfícies articulares que constituem a articulação MCF. O mapeamento dessas variações resultou em padrões de distribuição topográfica visíveis, com um arranjo geral semelhante. Em uma projeção dorsopalmar, as áreas da superfície articular são sequencialmente e diferentemente carregadas durante um movimento completo (BRAMA et al., 2000).

O conteúdo de glicosaminoglicanos na margem dorsoproximal da primeira falange e na margem dorsodistal do III metacarpiano, onde o padrão de carga é diferente, são significativamente menores. Sendo assim, Brama *et al.* (2000) inferiram que a cartilagem sujeita a cargas intermitentes não responde da mesma forma que o tecido submetido a cargas constantes. Consequentemente, as áreas mais centrais da articulação têm uma maior resiliência, devido à influência benéfica do carregamento regular, quando comparadas às margens dorsais da mesma articulação. Estas diferenças nas propriedades bioquímicas das superfícies articulares, em combinação com a carga intermitente são, até certo ponto, imprevisíveis (BRAMA et al., 2000). Alterações degenerativas precoces frequentemente encontradas na margem dorsodistal do metacarpiano em cavalos adultos podem ser vistas como uma consequência desse processo (MURRAY et al., 1995). A

carga influencia na disposição da rede de colágeno, e dessa forma sugere-se que a carga conduz o requerimento e a produção funcional do tecido (BRAMA et al., 2000).

Os níveis de hidroxilisina, um dos aminoácidos estruturais do colágeno, foram significativamente mais baixos dorsal que sagitalmente. Tem sido demonstrado que níveis elevados de hidroxilisina no colagénio tipo I estão associados com força biomecânica inferior no osso (YANG et al., 1993; KNOTT et al., 1995). Sendo essa informação aplicável para o colágeno tipo II na cartilagem, o teor mais baixo de hidroxilisina pode estar relacionado com força biomecânica mais elevada nestes locais intensamente carregados.

Brama *et al.* (2000) mostraram que existem diferenças significativas entre a articulação MCF esquerda e direita quanto ao conteúdo de glicosaminoglicanos e água, sendo que o membro direito mostrou níveis mais elevados para ambos.

Murray *et al.* (1995) encontraram disparidades significativas nas propriedades biomecânicas da cartilagem entre as articulações esquerda e direita de carpos normais dos equinos. A cartilagem direita foi significativamente mais rígida quando comparada à cartilagem esquerda, contudo a espessura não diferiu. Esses achados corroboram a existência de uma correlação positiva entre glicosaminoglicanos, condrócitos e rigidez da cartilagem articular, sugerindo que os cavalos utilizam os membros torácicos em disparidade (MURRAY et al., 1995).

A partir destes dois estudos de Murray (1995) e Brama (2000), conclui-se que existem grandes diferenças na composição da matriz extracelular dentro de uma mesma articulação e entre articulações dos membros esquerdo e direito. Essas diferenças provavelmente refletem a resposta da cartilagem articular a diferentes condições de sobrecarga. Isso também pode ajudar a explicar a especificidade do local de lesões osteocondrais que são comumente encontrados na articulação. Finalmente, esses achados enfatizam que a escolha dos locais de amostragem ao investigar as propriedades bioquímicas e estruturais da cartilagem pode ter profunda influência no resultado obtido (MURRAY et al., 1995; BRAMA et al., 2000).

2.3. OSSO SUBCONDRAI

Apesar das características de cada articulação em particular ser geneticamente pré-determinada, as estruturais resultam de seu histórico de sobrecarga. O osso subcondral

(OSC) inclui pelo menos três estruturas bem diferenciadas: a cartilagem calcificada, o osso lamelar cortical e o osso subcondral trabecular. As duas primeiras são conhecidas na literatura como placa subcondral. Alguns autores consideram também a existência de um osso trabecular subarticular, em continuidade com o trabecular, cujos limites não estão bem definidos (BURR, 2004). A espessura varia em função da espécie animal, idade, massa corporal, localização e tipo de articulação. A exemplo, a espessura ao nível do platô tibial humano pode chegar aos 2-3 mm (BURR, 2004) e 2 mm para terceiro metacarpiano em equinos na zona de maior carga (KAWCAK et al., 2000). Sua espessura atinge seu máximo nos jovens e nos sítios de sustentação máxima de peso (ZACHARY; McGAVIN, 2013).

O OSC é o tecido subarticular mineralizado que se estende desde a união entre a cartilagem calcificada e a não calcificada até ao início da medula óssea. Suas funções principais consistem em dar suporte à cartilagem articular suprajacente, distribuir a carga mecânica na diáfise cortical subjacente, absorver as forças contínuas de impactos mecânicos e nutrir as camadas profundas da cartilagem hialina, especialmente na fase de crescimento (BURR, 2004; ZACHARY; McGAVIN, 2013).

A importância da qualidade do osso subcondral no reparo da cartilagem está sendo cada vez mais reconhecida e estudada (MAINIL-VARLET et al., 2003; HOEMANN et al., 2007, 2011; MINAS et al., 2009; WILLIAMSON et al., 2018).

Diferentemente da cartilagem, o OSC absorve a maior parte do impacto e o aumento de carga mecânica no osso suprime a fase de reabsorção óssea, levando ao espessamento trabecular ou esclerose. Esta esclerose aumenta a rigidez do osso e transfere as forças de volta para a cartilagem (NORRDIN; KAWCAK; WAYNE McILWRAITH, 1998). Diferentes forças e cargas compressivas podem interferir no crescimento da cartilagem e ossificação (YTREHUS, B.; CARLSON, C. S.; EKMAN, 2007a; ZACHARY; McGAVIN, 2013).

No estudo de Norrdin (1998), cavalos de corrida em pista foram comparados com exercitados em esteira. A análise geral das articulações metacarpo/metatarsofalangeanas de cavalos de corrida revelou alterações na superfície condilar, que variou desde fibrilação e erosão focal da cartilagem a cavitação em osso subcondral. Como essas lesões representaram um espectro de artrose induzida mecanicamente, sugere-se que essas micro lesões tenham grande importância para articulação. Lesões mais leves apresentaram espessamento do osso subcondral e osso trabecular subjacente. Com o avanço da esclerose, houve maior quantidade de necrose osteocondral. Canais vasculares ocasionais

com debris celulares estavam presentes abaixo da cartilagem. Linhas de fragmentação aparentes na região subcondral sugeriu maior fragilidade da matriz, além das microfraturas trabeculares irregulares desenvolvidas a uma profundidade de alguns milímetros abaixo da cartilagem hialina (NORRDIN; KAWCAK; WAYNE McILWRAITH, 1998).

Durante o movimento de galope, a região palmar do côndilo metacarpiano é uma área que recebe traumas repetitivos no cavalo. Quando apenas um membro está em apoio, presume-se que a superfície palmar do côndilo estendido seja exposta a forças compressivas, bem como forças de cisalhamento no local de contato com o sesamóide. Durante a extensão, o local de maior falha articular está na crista transversal do côndilo, onde a extremidade distal do osso sesamóide oposto entra em contato com o côndilo em extensão. Essas forças repetidamente podem causar lesões na cartilagem articular. Alterações que levam à claudicação geralmente ocorrem no final das corridas e sabe-se que a máxima extensão é vista neste momento (NORRDIN; KAWCAK; WAYNE McILWRAITH, 1998).

2.4. MÉTODOS DE EXAMES DE IMAGEM

Dentre os exames auxiliares atualmente utilizados para avaliar as articulações, apresentam-se a radiografia, a ultrassonografia, a ressonância magnética, a tomografia computadorizada, a cintigrafia, a artroscopia, a termografia e os estudos biomecânicos. (CARRIG, 1997; WEEKES; MURRAY; DYSON, 2004; WEIGEL et al., 2005; DYSON; MURRAY, 2006; HIRVINEN et al., 2009; TROPE; ANDERSON; WHITTON, 2011; ROCHA, 2012). Dentre eles, os mais rotineiros para a medicina equina são a radiografia e a ultrassonografia.

A articulação MCF é composta pelo terceiro metacarpiano, falange proximal (F1) e os ossos sesamóides proximais emparelhados. Para avaliar com precisão essa articulação, imagens radiográficas de qualidade devem ser obtidas (MORGAN, 2013). Dentre as áreas que podem ser avaliadas pelo exame radiográfico estão: a placa óssea subcondral, o osso subcondral trabecular (epífise), as margens articulares e as áreas de união entre ligamentos, tendões e cápsula articular. O espaço articular aparece radioluscente, entre as superfícies da placa óssea subcondral, sendo uma medida da espessura da cartilagem articular. Desta forma, esta medida pode ser utilizada para avaliar

a perda da cartilagem articular. O tamanho deste espaço varia entre as articulações, com a idade do animal e com a carga suportada pela articulação (CARRIG, 1997).

Existem quatro projeções utilizadas rotineiramente na veterinária, as quais são: lateromedial (LM), dorsopalmar (DP), e duas oblíquas 45° em incidências lateral e medial dorsolateral-palmaromedial (DLPM) e dorsomedial-lateropalmar (DPLM) (EDWARDS, 1984; RICHARD; ALEXANDER, 2007). Em uma radiografia lateromedial, a superfície articular distal do III metacarpiano descreve uma curva homogênea com um suave achatamento no seu aspecto palmarodistal. Na projeção dorsopalmar, a articulação deve estar aproximadamente simétrica, e sugere-se que o côndilo medial seja mais amplo que o lateral, o que pode ser confirmado a partir do exame macroscópico (EDWARDS, 1984; MORGAN, 2013).

Apesar de ser um método diagnóstico pouco preciso para estes tecidos, alterações radiográficas podem ser encontradas, principalmente ao analisar o osso subcondral. Dentre elas estão os osteófitos e/ou enteseófitos periarticulares, lise do osso subcondral e/ou esclerose, irregularidades e estreitamento do espaço articular ou colapso articular. Na região palmar/plantar, em lesões iniciais visualizam-se áreas radiotransparentes curvilíneas do osso subcondral com contorno normal, e em estágios avançados das doenças articulares existe uma área radiotransparente focal com contorno de aparência achatada ou cavitária. Para estes casos, a projeção lateromedial é a mais adequada para observação de lesões subcondrais de pequenas dimensões (O'BRIEN, 2007). Com a técnica da densidade óptica em imagens radiográficas (DOR), há possibilidade de identificação de rarefação desde 12% de cálcio em peças ósseas efetuando-se a setorização das curvas características e a correção do efeito da não uniformidade da radiação-x (LOUZADA, 1994).

Com o exame ultrassonográfico têm-se as vantagens de não usar a radiação ionizante e permitir a avaliação dinâmica da cartilagem articular, além de tecidos moles articulares e periarticulares e, como desvantagem principal, a impermeabilidade do osso às ondas sonoras, o que limita o acesso a determinadas regiões das articulações (NEVES, 2010). A articulação metacarpofalangeana pode ser examinada com um transdutor linear de alta frequência (7,5 – 10 MHz). A cartilagem deve ter uma aparência homogênea, dessa forma as margens articulares superficiais são avaliadas em cortes, com exatidão pela exploração da região com o transdutor (SMITH; SMITH, 2008). Na ultrassonografia as margens articulares devem ser hiperecogênicas, regulares e alinhadas com a superfície óssea (DENOIX; AGRÉGE, 2001). A cartilagem articular fisiologicamente tem

aparência regular que varia de hipoeecogênica a anecóica, localizada entre a membrana sinovial e o fluido sinovial e a porção hipereecogênica do osso subcondral; a cartilagem aparece como linha fina e regular, e a superfície do osso subcondral como linha fina hipereecogênica, também deve ser regular (DENOIX; AGRÉGE, 2001; REDDING, 2001).

No exame das articulações, a ultrassonografia é utilizada para avaliar alterações em sinóvia e líquido sinovial, além da identificação de lesões associadas aos ligamentos colaterais e meniscos, em espessamentos da cartilagem articular e lesões condrais (REEF; WHITTIER; ALLAM, 2005; SARIN et al., 2017), sendo uma técnica mais sensível que a radiografia para analisar alterações em margem articular (DENOIX; AGRÉGE, 2001).

Em estudo realizado por Eckstein (1995), a avaliação das superfícies articulares pelo uso da tomografia computadorizada revelou que seis meses de exercício em esteira levaram à maior mineralização do osso subcondral dos côndilos do terceiro metacarpiano (ECKSTEIN et al., 1995). Resultados semelhantes foram obtidos por Kawcak (2000), que avaliaram cotovelos humanos, em que diferenças na carga aplicada levaram a mudanças na mineralização óssea (KAWCAK et al., 2000).

Em continuidade ao estudo de Eckstein (1995), superfícies articulares incongruentes dos côndilos do terceiro metacarpiano foram evidentes nas imagens de tomografia computadorizada de cavalos do grupo controle (exercitados em esteira). A borda da superfície articular faz o contato antes do centro da superfície articular e a flexibilidade do osso subcondral dissipará as forças na articulação (ECKSTEIN et al., 1995). No entanto, uma configuração mais congruente com a superfície articular foi evidente nas imagens obtidas a partir de cavalos exercitados. Portanto, o exercício pode causar uma perda de incongruência na articulação metacarpofalangeana que leva à distribuição anormal do estresse na superfície articular, levando mudanças estruturais nesses locais (ECKSTEIN et al., 1995).

A técnica padrão para determinar a distribuição de colágeno na cartilagem articular se dá por meio de cortes histopatológicos e sua subsequente coloração. A visualização da fibrilação superficial é importante, pois alterações iniciais em doenças como osteoartrite são detectáveis por esse método de imagem, assim como por artroscopia. Além disso, essa característica está associada com propriedades biomecânicas da cartilagem (NIEMINEN et al., 2015).

O exame histológico representa o *gold standard* para avaliar início de lesões articulares (CARLSON; CULLINS; MEUTEN, 1995; OLSTAD et al., 2008). As

amostras ósseas requerem processamento demorado, como descalcificação, e são suscetíveis a artefatos. Dessa forma, as observações devem ser interpretadas com cautela. O exame histológico tende a ser limitado a estudos projetados em corte transversal, devido ao modo destrutivo da amostragem. Informações longitudinais podem, no entanto, ser inferidas (YTREHUS et al., 2004a, 2004b). Traumas podem alterar o conteúdo e a distribuição de água, proteoglicanos (PG) e colágeno, bem como tamanho, distribuição, orientação e densidade dos condrócitos. A rede de colágeno, importante para a biomecânica da cartilagem, pode ser interrompida em lesões degenerativas. Isso é evidenciado como fibrilação superficial, fendas e condensação de colágeno ao redor dos condrócitos. A degeneração pode levar à morte celular, particularmente na zona de transição. Não está claro se esse tipo de degeneração induz apoptose (NIEMINEN et al., 2015).

2.5. ANÁLISES MICROSCÓPICAS

Para a avaliação histológica do tecido de reparação da cartilagem deve-se considerar algumas características estruturais, as quais permitem à cartilagem desempenhar a sua função biomecânica. A cartilagem articular tem uma composição de tecido estratificado, organização zonal, superfície lisa e firme ancoragem ao osso subcondral, o que contribui para a sua capacidade única de suportar cargas conjuntas, reter água, deformar e rebater sob deslizamento e carga (HOEMANN et al., 2011).

A caracterização estrutural da cartilagem inclui minimamente imunocoloração para colágeno tipo II e colágeno tipo I, em combinação da coloração com H&E para avaliar características do tecido osteocondral e azul de toluidina para avaliar a deposição de glicosaminoglicanos. Em estudos pré-clínicos e clínicos para a reparação da cartilagem, a histologia pode ser utilizada como medida de resultado estrutural, uma vez que pode fornecer informações sobre o tipo de matriz e componentes celulares presentes e sua organização relativa (HOEMANN et al., 2011).

Mulder *et al.* (2006) validaram a microtomografia para estudos dos parâmetros morfométricos de tecido ósseo de equinos. De acordo com os autores, a microtomografia computadorizada (micro-TC) é um método preciso para detalhar as variáveis arquitetônicas bi e tridimensionais de osso trabecular e as propriedades físicas do osso de uma maneira não destrutiva. Sua alta resolução permite uma análise precisa e detalhada dos ossos (MULDER et al., 2006).

Batiste *et al.* (2004), em estudo comparativo de articulações femorotibial de coelhos, induziram osteoartrite com a secção do ligamento cruzado anterior e compararam com animais hígidos. A avaliação por microtomografia computadorizada se mostrou um modelo de imagem suficiente para observar alterações articulares e em osso subcondral, sendo possível análises de deterioração de cartilagem articular e cistos subcondrais (BATISTE *et al.*, 2004).

A tomografia computadorizada (TC) é uma técnica focada na análise das estruturas ósseas, apesar de ser possível obter informações de tecidos moles com esta modalidade, principalmente quando evidenciadas pelo uso de meios de contraste. Lesões ósseas encontradas na clínica foram previamente examinadas por TC em cavalos (OLSTAD *et al.*, 2007, 2008) e cães (GIELEN; RYSEN; BREE, 2005). A micro-TC é uma técnica que se limita a uma amostra de até 70 mm de comprimento, gerando imagens mais detalhadas de pequenos objetos. Essa técnica foi utilizada com sucesso para examinar a ossificação endocondral em termos de desenvolvimento de placa óssea subcondral. As lesões detectadas com micro-TC no processo coronóide intermediário do potro de duas semanas de idade e crista troclear lateral do potro de seis semanas de idade foram associadas a alterações radiográficas mais acentuadas (OLSTAD *et al.*, 2007). A micro-TC requer um mínimo de processamento da amostra e os artefatos são reduzidos em comparação com a radiografia planar convencional, porém não conseguiu identificar as alterações celulares (GIELEN; RYSEN; BREE, 2005; OLSTAD *et al.*, 2007, 2008).

As unidades de Hounsfield são rotineiramente usadas na TC para comparar densidades de diferentes materiais. O uso dessa unidade oferece um método de comparar as densidades relativas de tecidos (REEVES; MAH; McDAVID, 2012). Em um estudo realizado com equinos Quarto de milha, visou-se estudar o efeito da iniciação do treinamento físico em cavalos jovens e sua relação com a vitamina K. A distribuição relativa da densidade óssea foi medida em unidades de Hounsfield e categorizado como osso de baixa, média e alta densidade, correspondendo 800 a 1.199, 1.200 a 1.299 e 1.300 a 3.000 HU, respectivamente. Os cavalos exercitados tiveram uma significativa menor porcentagem de osso de baixa densidade (regiões brancas; 800 a 1.199 HU; $P < 0,01$) e uma significativa maior porcentagem de osso de alta densidade (regiões negras; 1.300 a 3.000 HU; $P < 0,01$) na superfície do côndilo do terceiro metacarpiano que os controles (SICILIANO; KAWCAK; McILWRAITH, 2000).

Cada vez mais vem crescendo o número de estudos revelando a alta prevalência de alterações em exames de imagem em cavalos de esporte, embora alguns achados não

se relacionem à presença de sinais clínicos em muitos animais (BELOTTA et al., 2014; LILEY et al., 2017; CRESSWELL et al., 2018; SPRIET et al., 2018). Os exames de imagem não devem substituir o exame físico e de claudicação, entretanto, são muito importantes e complementam a avaliação da extensão das alterações, o comprometimento das estruturas adjacentes, na evolução clínica do paciente, efetividade do tratamento instituído, além de contribuir para o estabelecimento de um prognóstico clínico ou atlético (BELOTTA et al., 2014).

3. OBJETIVO

Teve-se como objetivo avaliar através de técnicas de imagem (radiografia, ultrassonografia, microtomografia computadorizada e histologia) a estrutura da cartilagem hialina e do osso subcondral da articulação metacarpofalangeana de equinos da raça Puro-Sangue-Inglês (PSI) de corrida em treinamento. A região avaliada foi especificamente a crista sagital e côndilos da superfície do III metacarpiano. Esse projeto faz parte de linha de pesquisa correlacionando métodos de imagem com lesões osteocondrais de equinos atletas em treinamento.

4. MATERIAL E MÉTODO

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob número de protocolo CEUA nº 9971210617.

Foram coletadas amostras de oito pares de peças anatômicas de membros torácicos de equinos da raça Puro-Sangue-Inglês (PSI) de corrida, com idade entre dois a cinco anos, que vieram a óbito no Jockey Club de São Paulo (JCSP), sendo oito membros torácicos esquerdos e oito membros torácicos direitos correspondentes. O sexo dos animais não foi fator selecionador. Foram selecionados equinos que vieram a óbito ou foram submetidos à eutanásia por motivos não relacionados a afecções da articulação MCF e sem relatos de queixa clínica manifesta nessa região.

Algumas informações sobre os animais foram coletadas tais como idade, sexo, quantidade de apresentações e competições que participou, e motivo do óbito. Esses dados seguem na tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Características dos animais utilizados durante o estudo, relacionando idade, sexo, número de apresentações e a *causa mortis* (fornecidos por Jockey Club, 2018)

Animal	Idade (anos)	Sexo	Número de apresentações	Motivo do óbito
01	2,5	M	1	Pós-cirúrgico de laparotomia (enterocolite)
02	5	M	9	Fratura de tíbia
03	4	F	7	Morte súbita após Hemorragia Pulmonar
04	3	M	5	Enterocolite
05	4	F	Estreante	Fratura de olécrano
06	4	M	3	Polifratura em competição
07	2,5	M	3	Indefinido (morte súbita)
08	4	F	7	Hérnia de hiato

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Os páreos no JCSP ocorrem geralmente duas vezes na semana (sábados e segundas-feiras). A pista de corrida oficial é de areia e os animais correm em sentido anti-horário, ou seja, com o membro torácico esquerdo em direção centrípeta. Alguns acidentes que ocorrem durante os páreos são atendidos na pista, e em casos mais graves são retirados com ambulância devidamente equipada do próprio Jockey. O Hipódromo conta com centro cirúrgico para intervenções necessárias, além de sala de necropsia equipada com câmara fria.

Por meio das devidas técnicas de necropsia, ambos membros torácicos dos animais selecionados foram removidos do esqueleto axial dos animais e desarticulados na radiocárpica ou proximal a essa articulação. Até a utilização e aquisição das imagens, os membros permaneceram congelados em *freezer* de -20°C com posterior descongelamento por submersão em água fria. A partir disso, o membro era alocado em um anteparo de madeira que o sustentava, mimetizando o apoio natural ao solo. Com a peça fixada no suporte eram realizados os exames radiográfico (Figura 1) e ultrassonográfico.

Figura 1. Imagem durante realização do exame radiográfico, com destaque para o membro fixado em suporte de madeira mimetizando a posição natural de apoio

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2018).

Posteriormente, após todos os exames de imagem com a peça na íntegra, colocava-se a peça em suporte metálico, prendendo o metacarpiano principal para que ficasse imóvel, permitindo a artrotomia e inspeção macroscópica da superfície articular, bem como registro fotográfico da superfície articular.

Após registradas em imagens fotográficas simples, realizaram-se as biopsias da superfície do terceiro metacarpiano (Figura 2). As biopsias osteocondrais foram realizadas no prazo máximo de 6 horas após o descongelamento total das peças. Foram biopsiadas amostras da crista sagital e dos côndilos medial e lateral, abrangendo cartilagem e osso subcondral do terceiro metacarpiano dos membros torácicos, retirados do ponto de maior contato entre os ossos (Figura 2).

Figura 2. Imagem demonstrando os locais de realização de biopsias osteocondrais na face articular do terceiro metacarpiano (xis preto)

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2017).

Essas amostras foram colhidas com o auxílio de *punch* de biopsia circular de 5 mm de diâmetro de inox 316L (Figura 3), abrangendo cartilagem articular e osso subcondral de diferentes profundidades, a depender da espessura da cartilagem ou da consistência do osso subcondral. Os fragmentos ósseos foram marcados dorsal e medialmente com caneta marcadora permanente, porém, ao permanecer imersos no fixador, as marcações se apagaram.

Figura 3. (A) Dispositivo utilizado para retirada das amostras de biopsias ósseas, com bordo circular cortante em sua extremidade; (B) Coleta dos fragmentos ósseos, em destaque para a crista sagital na imagem

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2017).

As amostras foram conservadas e fixadas imersas em paraformaldeído 4% em tubos Falcon de 15 ml. Estas eram dispostas separadas por borracha EVA de 3 mm dentro dos tubos para o escaneamento separadamente no microtomógrafo e conservação até posterior processamento histológico.

Os métodos de avaliação de imagem serão detalhados a seguir. Cada qual foi avaliado por três médicos veterinários experientes na técnica abordada.

4.1. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

As 16 peças foram descongeladas em água fria por seis horas, e após a remoção dos pelos sobre a articulação e posicionamento no anteparo de madeira, o exame teve início. Essas foram submetidas às avaliações ultrassonográficas, principalmente da superfície articular do III metacarpiano e suas estruturas adjacentes. O exame foi realizado por um único operador, seguindo sempre uma mesma sequência de locais de obtenção das imagens. Durante o exame foram consideradas todas as faces articulares alcançadas pelo exame, com o transdutor tanto em posição longitudinal como transversal, com a articulação em apoio (com o auxílio do anteparo de madeira). Todas as imagens foram armazenadas em sistema digital para posterior avaliação por pares, seguindo o quadro 1. Além disso, foram analisadas a espessura e regularidade da linha superficial da cartilagem articular, ecogenicidade e homogeneidade dos ligamentos periarticulares. Para tal foi utilizado o aparelho de Ultrassom MyLab™30 Gold VET, com transdutor linear 7 a 10 MHz, da marca ESAOTE e o auxílio do *standoff pad* recoberto por gel específico de ultrassom, para maior contato da probe com a pele. Os exames foram realizados nas dependências do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP.

Quadro 1. Parâmetros avaliados através do exame ultrassonográfico (adaptado de SILVA, M. M., 2014)

Parâmetros avaliados através do exame ultrassonográfico		
<i>Parâmetros</i>	<i>Pontuação</i>	<i>Descrição</i>
Ligamentos periarticulares segundo área de origem/inserção	0	Sem alteração
	1	Presença de irregularidades
	2	Proliferação óssea
	3	Proliferação óssea intensa
	4	Proliferação intensa e presença de fragmentos
Superfície articular segundo a espessura da cartilagem articular	0	Linha de cartilagem bem definida, contínua, lisa e facilmente identificável
	1	Linha de cartilagem de difícil identificação, porções observadas lisa e contínua e detectada em mais de 50% das superfícies avaliada
	2	Linha de cartilagem de difícil identificação, porção descontínua e rugosa

Osso subcondral segundo a superfície	3	Sem identificação da linha de cartilagem, presença de fragmento articular
	4	Ausência de linha de cartilagem e alteração difusa da superfície do osso subcondral
	0	Superfície lisa
	1	Discreta irregularidade focal
	2	Superfície irregular
	3	Presença de áreas de depressão
	4	Erosão completa
	0	Bordo articular liso
	1	Pequenas irregularidades focais
	2	Bordo articular rugoso
Osso subcondral segundo a presença de osteófitos	3	Presença de osteófitos
	4	Osteófitos grandes e/ou fragmentos

Fonte: Adaptado de SILVA, M. M. (2014).

4.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Com o membro torácico disposto no mesmo anteparo posicionado para o exame ultrassonográfico, as imagens radiográficas foram registradas. Utilizou-se o aparelho Sound Eklin Digital Min X Ray®, da marca Mark IIG, TR90 – Illinois, USA. O exame compreendeu as projeções: lateromedial, dorsopalmar, oblíquas dorsomedial-palmarolateral 45° e dorsolateral-palmaromedial 45°, objetivando a análise individual das estruturas articulares do terceiro metacarpiano. A técnica utilizada de exposição foi de 80 kV e 3,2 mA (MORGAN, 2013). Entre as áreas ósseas avaliadas por esse exame estão: a placa óssea subcondral, o osso subcondral trabecular (epífise) e as margens articulares. Cada avaliador pontuou as imagens de acordo com o quadro 2.

Quadro 2. Parâmetros avaliados ao exame radiográfico, adaptado (SILVA, 2014)

Parâmetros avaliados através do exame radiográfico		
Parâmetro	Pontuação	Descrição
Diminuição da interlinha radiográfica	0	Normal
	1	Suspeito

Diminuição da interlinha radiográfica	2	Leve estreitamento com orientação simétrica ou assimétrica
	3	Moderado estreitamento de forma simétrica ou assimétrica e mantendo a definição
	4	Acentuado estreitamento com pouca definição
	5	Indefinição da interlinha radiográfica
	0	Nenhum
	1	Discreta projeção óssea localizada em uma das faces ósseas
Evidência de osteófitos e/ou proliferações ósseas	2	Discretas projeções ósseas entre as faces ósseas
	3	Projeção óssea proeminente, organizada e localizada
	4	Projeções ósseas proeminentes, organizadas observadas em mais de uma projeção
	5	Extensas projeções ósseas irregulares observadas em mais de uma projeção
	0	Nenhum
Presença de esclerose subcondral	1	Suspeita ou placa óssea subcondral discretamente mais densa
	2	Área de esclerose localizada
	3	Moderada esclerose subcondral difusa e de densidade radiográfica com distribuição heterogênea
	4	Moderada esclerose subcondral difusa e de densidade radiográfica com distribuição homogênea
Presença de esclerose subcondral	5	Evidente esclerose subcondral difusa e estendendo para a trabeculação da epífise
	0	Nenhuma
	1	Pequenas ondulações na margem subcondral, levemente irregular
Presença de osteólise subcondral	2	Erosão superficial do osso subcondral localizada
	3	Erosão superficial do osso subcondral generalizada
	4	Erosão irregular proeminente ou lise cística na margem subcondral ou com discreta extensão para a epífise

Evidência de fragmentos osteocondrais	5	Severa erosão ou lesão cística estendendo-se pela epífise
	0	Nenhum
	1	Fragmento osteocondral único sutil pouco definido e não deslocado
	2	Fragmento osteocondral único bem definido e não deslocado
	3	Fragmento osteocondral único bem definido e deslocado
	4	Dois fragmentos bem definidos e não deslocados
	5	Múltiplos fragmentos no local ou deslocados
	0	Ausente
	1	Menor ou igual a 5mm
	2	Entre 6 a 10 mm
Tamanho do fragmento osteocondral	3	Entre 11 a 15mm
	4	Entre 15 e 19 mm
	5	Acima de 20mm

Fonte: Adaptado de SILVA, M. M. (2014).

As imagens foram submetidas à avaliação por pares, não participantes ativamente, subjetivando-se com o auxílio de escore pré-definido adaptado de (SILVA, 2014).

4.3. DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA

Para a comparação da densidade óssea, foi utilizado o método de Densitometria Óptica Radiográfica (DOR). Esse método utiliza um penetrômetro confeccionado em liga de alumínio específica. A escala utilizada no projeto possui como características 10 degraus de alumínio medindo 34x14mm cada. A escala foi posicionada e fixada na placa de captação no momento da aquisição das imagens, para a calibração do sistema de tonalidades e posterior determinação da densidade óssea de cada imagem. Analisa-se comparativamente as graduações do tecido ósseo com a escala obtendo-se a densidade óssea em degraus de penetrômetro.

As imagens radiográficas foram analisadas com o auxílio do *software* ImageJ® 1.52a, a partir do qual foi possível determinar a densidade óptica em pixels e depois

convertida para valores da escala. A região de interesse (ROI) para o cálculo da densidade óssea foi baseado no trabalho de Whitton (2010), abrangendo regiões específicas de côndilos do terceiro metacarpiano. Seguindo o mesmo formato calculou-se a crista sagital na mesma imagem.

Sabe-se que apesar da rigorosa padronização da técnica radiográfica, não é possível a obtenção de imagens idênticas com relação à variação de tonalidade de cinza. Por esse motivo, cada imagem radiográfica foi obtida com o penetrômetro e para cada imagem foi realizada uma análise das tonalidades de cinza individual.

As imagens foram salvas em formato JPEG para o processamento e transformadas em 8-bits para análise. Com a ferramenta de seleção de área retangular do programa selecionou-se a área central de cada degrau do penetrômetro, e aferiu-se a tonalidade média de cinza. Essa tonalidade pode variar de 0 a 255, sendo o primeiro totalmente preto até totalmente branco. A sequência de medidas seguiu do primeiro degrau, mais fino e menos radiopaco, até o nono degrau, mais espesso e radiopaco (Figura 4).

Figura 4. Avaliação e mensuração de densidade óssea no *software* ImageJ. Radiografia dorsopalmar com ROI em côndilos e crista sagital (círculos azuis), escala de alumínio para padronização dos valores (retângulo amarelo). Ao lado, janela do programa com os valores obtidos para cada degrau e cada região de interesse (ROI), sendo os três primeiros os ROI seguidos dos valores dos degraus

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

A mensuração foi realizada segundo Whitton e colaboradores (2010), que estudaram as regiões mais acometidas do terceiro metacarpiano, analisando em teste biomecânico *in vitro* e com micro-TC de alta resolução (WHITTON et al., 2010). A partir disso, obteve-se que a área avaliada deveria compreender os seguintes limites: a) profundidade: metade da altura da crista sagital; b) limite distal: cartilagem articular; c) limite lateral: o ponto mais distal e retilíneo do côndilo; e, d) limite medial: início da fossa sagital. Dessa forma, as regiões foram mensuradas e delimitadas previamente no programa ImageJ e depois selecionadas com a ferramenta elipse e então mensurados seus valores (Figura 4).

Os valores obtidos foram armazenados em tabelas para cada imagem analisada, a fim de cada uma ter sua própria escala, evitando divergência entre as imagens.

Após a padronização e mensuração dos valores de cinza do penetrômetro, a ferramenta de seleção elipse foi utilizada para selecionar a região dos côndilos e crista sagital (círculos azuis da Figura 4), e selecionado a ferramenta “mensuração” dessas áreas pelo programa. Tais valores foram registrados em tabelas juntamente com as informações de suas respectivas escalas de alumínio, para então serem convertidos aos degraus da escala e à unidade de mmAl, com o auxílio do *software* Microsoft Office Excel 2013®, utilizando a função “tendência”. A partir disso é possível quantificar objetivamente a densidade óssea de cada região.

4.4. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Após realizar os exames ultrassonográfico e radiográfico, a articulação foi exposta e fotografada. A superfície articular foi analisada macroscopicamente por três avaliadores e pontuada seguindo o padrão do quadro 3.

Quadro 3. Estágios e escores macroscópico para descrever lesões visíveis nos cêndilos do terceiro metacarpiano

Aspecto geral macroscópico		
<i>Parâmetro</i>	<i>Pontuação</i>	<i>Descrição</i>
Presença de linhas	0	Nada digno de nota
	1	1-2 Linhas parciais de desgaste de espessura/superfície articular
	2	3-5 linhas parciais ou 1-2 linhas completas de desgaste/superfície articular
	3	>5 linhas parciais ou >2 linhas completas de desgaste/superfície articular
Presença de erosões	0	Nada digno de nota
	1	Erosão com espessura parcial <5mm de diâmetro
	2	Erosão com espessura parcial >5mm de diâmetro
	3	Erosão completa da espessura
Artrose palmar (lesões osteocondrais no aspecto distal palmar do metacarpiano)	0	Nada digno de nota
	1	Erosão com espessura parcial <5mm de diâmetro
	2	Erosão com espessura parcial, descoloração púrpura, >5mm de diâmetro
	3	Erosão completa da espessura, descoloração púrpura, >5mm de diâmetro

Fonte: McILWRAITH (2010).

4.5. MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (Micro-TC)

As imagens obtidas foram provenientes das biopsias ósseas realizadas nas superfícies articulares das peças anteriormente coletadas e descongeladas. As amostras tinham 50 mm de diâmetro e variaram de 20 e 60 mm de comprimento. Para a obtenção das imagens, cada fragmento ficou encaixado entre dois cilindros de 50 mm de borracha EVA, de 3 mm de espessura, preta, colocados no interior de um tubo Falcon de 15 ml preenchido com o fixador paraformaldeído 4% (Figura 5A).

Figura 5. (A) Detalhe à esquerda do fragmento biopsiado ($\varnothing$ 50 mm e 60 mm comprimento). À direita, tubo Falcon de 15ml preenchido com paraformaldeído 4% e amostras dispostas separadamente por borracha preta EVA 3 mm; (B) Fragmento retirado de crista sagital antes de ser colocado no tubo

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2017).

Foi utilizado o microtomógrafo computadorizado de raios-x Skyscan 1176 (Skyscan, Bélgica). As imagens foram realizadas no Laboratório de Microtomografia Computadorizada, localizado no Instituto de Biociências (IB) da USP. O escaneamento ocorreu por técnica de 65kV e 382 μ A, a partir de cortes de 0,5 cm e qualidade de 18 μ m, em um filtro de 1,0 mm de Alumínio. O *software* utilizado para reconstituir as imagens escaneadas foi o *Bruker - MicroCT N-Recon*. Posteriormente, os dados foram analisados em programa de *software* específico do aparelho Skyscan da Bruker, o CTAnalyser versão 1.17.7.2 (64 bits) para imagens em 2D.

As amostras são em escala micrométrica e contém informações sobre sua porosidade, trabeculado do osso subcondral e espessura da cartilagem hialina. Dentre os parâmetros possíveis de serem analisados, destacam-se os mais relevantes para o presente estudo: a área óssea (BAr/TAr, %), que é a razão entre a área de tecido ósseo e a área total da amostra. Além disso, foram analisadas a separação (Tb.Sp, mm) e espessura trabecular ósseo (Tb.Th, mm) e, por fim, o número de trabéculas ósseas por mm de tecido (Tb.N, mm⁻¹) em cada um dos fragmentos.

Para avaliação das amostras, foram comparados os dados supracitados entre cada região biopsiada e expostos na tabela 5. A região de interesse considerada foi de dimensões de 5mm x 5mm x 3mm (FIRTH *et. al*, 2005; CONOR *et al.*, 2016; HASSAN *et al.*, 2017). As imagens foram binarizadas e para cada imagem o *threshold* em escala de

cinza foi automatizado, sendo seu máximo alcance em 255. *Threshold* é o ponto no qual um estímulo tem intensidade suficiente para começar a produzir um efeito.

Alguns padrões de unidade foram utilizados como forma de comparação entre os resultados das amostras (Quadro 4). Unidades como a de Hounsfield, uma escala quantitativa que descreve a radiodensidade e a densidade mineral óssea (g/cm^3) são muito utilizadas na área da radiologia. Valores de referência de densidade mineral óssea a seguir são calculados de côndilo medial de fêmur de equinos (HURTIG *et al.*, 2014). Os valores da escala de Hounsfield foram de acordo com metodologia anteriormente proposta, que avalia terceiro metacarpiano de equinos em treinamento ou não (SICILIANO; KAWCAK; McILWRAITH, 2000).

Quadro 4. Valores padrões de DMO e HU adotados por esses autores e utilizados como base no presente trabalho

	<i>Densidade Mineral Óssea</i>	<i>Escala Hounsfield</i>
Unidade	$0.75 \pm 0.18 \text{ g}/\text{cm}^3$ e $0.64 \pm 0.24 \text{ g}/\text{cm}^3$ (HURTIG <i>et. al.</i> , 2014)	+800 (osso esponjoso) a +3000 (osso denso) (SICILIANO <i>et. al.</i> , 2000)

Fonte: MARSIGLIA, M.F. (2019).

Para a Densidade Mineral Óssea de Hurtig (2014), no quadro 4, são apresentados dois valores, sendo valores da densidade de profundidades de 1 mm e 3 mm do osso subcondral, respectivamente.

4.6. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Para a realização das análises histológicas, 48 cortes de 5mm de diâmetro, de cada região (côndilos e crista sagital), foram previamente descalcificados em ácido fórmico, por quatro meses, através de protocolo já estabelecido pela ICRS (HOEMANN *et al.*, 2011). Os blocos em parafina permaneceram por 12 horas imersos em água sob refrigeração, antes de serem cortados no micrótomo, com $6\mu\text{m}$ de espessura. Os cortes foram distendidos em lâminas histológicas e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (H&E) e Azul de Toluidina.

Os protocolos de coloração utilizados foram os preconizados no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia (VPT) da FMVZ USP. As lâminas com as amostras desparafinizadas após permanecer por 6 horas em estufa a 80°C , foram imersas na seguinte sequência de soluções:

- ✓ 1. Xilol 1 por 10 minutos;
- ✓ 2. Xilol 2 por 10 minutos;
- ✓ 3. Xilol 3 por 10 minutos;
- ✓ 4. Álcool absoluto por 3 minutos;
- ✓ 5. Álcool 95% por 3 minutos;
- ✓ 6. Álcool 70% por 3 minutos;
- ✓ 7. Permaneceu em água de torneira corrente por 3 minutos;
- ✓ 8. Imersão em Hematoxilina por 9 minutos;
- ✓ 9. Permaneceu em água corrente para retirar o excesso de corante;
- ✓ 10. Imersão em álcool ácido e rapidamente retirado;
- ✓ 11. Deixado em lavagem na água corrente por 10 minutos;
- ✓ 12. Imersão parar corar com Eosina por 90 segundos;
- ✓ 13. Álcool 95% rapidamente;
- ✓ 14. Álcool absoluto por 2 minutos seguido por outro álcool absoluto por 3 minutos;
- ✓ 15. Álcool xilol por 3 minutos e por fim o xilol diafanizador por mais 3 minutos.

A hematoxilina cora os núcleos em azul, enquanto a eosina cora a proteína do osso, cartilagem e tecido fibroso em rosa. O método H&E é excelente para diferenciar colágeno mineralizado do não-mineralizado ou tecido fibroso. Essa coloração diferencia os limites entre osso e cartilagem. A coloração de H&E diferencia a região de cartilagem articular e crescimento celular (proteoglicanos, condrócitos e colágeno tipo II) corados em violeta, da região em tons de azul claro ou roxo, que não contém colágeno.

Para a avaliação objetiva do material, foi utilizada a escala histológica da Sociedade de Avaliação Histológica Visual (ICRS – II) de 2010, que seleciona características a fim de qualificar e quantificar as amostras. Entre esses parâmetros estão a regularidade da superfície, integridade basal, morfologia das células e coloração da matriz. A análise das lâminas foi realizada por microscopia óptica e foram considerados os parâmetros de eleição da escala abordada. No quadro 5 seguem os parâmetros avaliados na cartilagem articular, em relação a suas células e estrutura.

Quadro 5. Sistema de pontuação histológica referente à cartilagem articular

Sistema de classificação microscópica para histologia da cartilagem articular		
<i>Parâmetro</i>	<i>Pontuação</i>	<i>Descrição</i>
Fibrilação/Fissuras	0	Sem alteração na superfície articular
	1	Fissuras na superfície articular restrito à zona superficial
	2	Fissuras que se estendem até a zona média
	3	Fissuras que se estendem até o começo da zona profunda
	4	Fissuras que se estendem ao longo da zona profunda
Perda focal de células	0	Quantidade esperada ao longo do corte
	1	10-20% da área sem células por campo 40x
	2	20-30% da área sem células por campo 40x
	3	40-50% da área sem células por campo 40x
	4	Mais de 50% da área sem células por campo 40x
Necrose de condrócitos	0	Secção normal sem necrose
	1	Apenas uma célula necrótica localizada perto da superfície articular (40x por objetiva)
	2	1-2 células necróticas localizadas perto da superfície articular (40x por objetiva)
Necrose de condrócitos	3	2-3 células necróticas localizadas perto da superfície articular (40x por objetiva)
	4	3-4 células necróticas localizadas perto da superfície articular (40x por objetiva)
Formação de aglomerado de condrócitos	0	Nenhum aglomerado formado
	1	Dois condrócitos (doublets) na mesma lacuna no aspecto superficial da secção da cartilagem articular
	2	2-3 condrócitos (doublets ou triplets) na mesma lacuna no aspecto superficial da secção da cartilagem articular

3	3-4 condrócitos na mesma lacuna no aspecto superficial da secção da cartilagem articular
4	Mais de 4 condrócitos na mesma lacuna no aspecto superficial da secção da cartilagem articular

Fonte: Modificado de McILWRAITH (2010).

No quadro 6 encontram-se os parâmetros histológicos avaliados na estrutura e características do osso em relação à cartilagem.

Quadro 6. Sistema de pontuação histológica referente ao osso subcondral

Sistema de classificação microscópica para histologia osteocondral		
<i>Parâmetros</i>	<i>Pontuação</i>	<i>Descrição</i>
Lesão osteocondral	0	Sem alteração em cartilagem ou osso
	1	Leve ruptura da matriz óssea subcondral. A lesão ocupa <25% da superfície histológica e não ultrapassa 1-2 mm de profundidade à junção de condrócitos normais. Pouca matriz dentro da lesão, mancha pálida e ocasionais espaços medulares contendo detritos. <i>Tidemark</i> pode estar duplicado. A fibrina pode estar presente na camada óssea subcondral. Nenhuma fibrilação superficial da cartilagem aparente.
	2	Grave ruptura da matriz óssea subcondral. Áreas da matriz são fragmentadas e cominutivas. A lesão ocupa 25-50% da superfície histológica e se estende por aproximadamente 2-4 mm de profundidade até a junção osteocondral normal. Uma quantidade significativa da matriz óssea subcondral é de coloração pálida, e há detritos significativos nos espaços medulares. <i>Tidemark</i> é duplicada e muitas vezes interrompida. Quantidades moderadas de fibrina presentes na camada óssea subcondral. A lesão sobrejacente da cartilagem é espessada com erosão e fibrilação superficial da cartilagem. A reparação da fibrocartilagem também é aparente nas camadas superficiais da cartilagem.

Remodelamento ósseo	3	Colapso completo do tecido osteocondral. A lesão ocupa > 50% da superfície histológica e estende-se 43 mm de profundidade até a junção osteocondral normal. Matriz óssea subcondral e fibrina são abundantes. <i>Tidemark</i> é duplicada e muitas vezes interrompida. Espessamento superficial da cartilagem e/ou fibrocartilagem presente e pode ser completamente separada da cartilagem profunda mais espessa
	4	Grave perda de tecido osteocondral deixando úlcera
	0	Sem alterações aparentes
	1	Algumas irregularidades do osso subcondral
	2	Avanço do osso subcondral na camada de cartilagem calcificada com margens ósseas subcondrais recortadas, mas sem atravessar o <i>tidemark</i>
	3	Avanço do osso subcondral através da camada de cartilagem calcificada, cruzando uma ou mais <i>tidemarks</i> , mas abaixo da <i>tidemark</i> mais superficial
	4	Avanço do osso subcondral através da camada de cartilagem calcificada e ruptura da <i>tidemark</i>
	0	Sem alteração aparente
	1	Lesões lineares simples com envolvimento do osso subcondral sem envolver <i>tidemark</i>
	2	Lesões lineares simples com envolvimento do <i>tidemark</i> e osso subcondral
Divisão osteocondral	3	Presença de fragmentos e debris dentro da divisão e conexões entre divisões
	4	Envolvimento da cartilagem articular e deslocamento de fragmentos de cartilagem calcificada para o osso subcondral subjacente

As amostras também foram coradas em Azul de Toluidina para subsequente avaliação. Essa coloração é metacromática, que cora a matriz de colágeno em azul e os glicosaminoglicanos sulfatados em roxo. O processamento para essa coloração segue a mesma sequência do H&E citada acima, até o processo 7. Depois dessa etapa, segue-se os passos abaixo:

- ✓ Xylol 10% por 11 minutos;
- ✓ Xylol 10% por 11 minutos;
- ✓ Xylol 10% por 4 minutos;
- ✓ Álcool 96% por 1 minuto;
- ✓ Álcool 96% por 1 minuto;
- ✓ Álcool 70% por 1 minuto;
- ✓ Permaneceu em água de torneira corrente por 1 minuto;
- ✓ Imersão em Azul de Toluidina 0,04% por 15 minutos;
- ✓ Permaneceu em água de torneira corrente por 3 minutos;
- ✓ Permaneceu por 9 minutos em temperatura ambiente sem líquido algum;
- ✓ Xylol 10% por 5 minutos;
- ✓ Álcool xilol por 3 minutos e por fim o xilol diafanizador por mais 3 minutos.

Após esse processamento as lâminas são montadas com lamínulas cobrindo a amostra, fixadas por cola resina.

O tecido cartilaginoso foi avaliado quanto à presença de alterações na deposição de proteoglicanos, o que pode ser indicado por variações na intensidade da cor azul, adquirida pelo tecido após o processo de coloração em azul de toluidina. A avaliação quantitativa das alterações foi realizada pela determinação da densidade ótica integrada (DOI) desta coloração. Esta forma de mensuração permite definir a densidade óptica (absorvância) relacionada com a área de interesse.

Foram selecionadas áreas do tecido sem artefatos de técnica, como dobras oriundas da obtenção dos cortes, depósito excessivo de corantes e ausência de algum dos segmentos que compõem a organização histológica da cartilagem.

Estas seções foram visualizadas através de fotomicroscópio Leica® modelo DM 750, equipado com sistema de análise de imagens. A digitalização das imagens foi realizada em aumento de 40x (objetiva de 4) por câmera de vídeo colorida Leica ICC50W, com sensor CCD (*charge-coupled device*), de alta definição, com resolução de 5 megapixels.

Em todas as lâminas, antes do início da captura das imagens, os parâmetros de iluminação e abertura de diafragma foram ajustados manualmente e, em seguida, realizada a calibração do “branco”, o que consistia no registro pelo sistema de captura, de uma área sem imagem e sua definição como referência de “branco”. Desta forma, foram reduzidos possíveis variações entre as imagens que poderiam interferir na análise.

As análises foram realizadas com auxílio do programa Image Pro-Plus ® 4.5 (Media Cybernetics), utilizando uma ferramenta de reconhecimento colorimétrico, onde o usuário indica ao sistema a cor de interesse, e a partir desta padronização, o sistema reconhece e quantifica os parâmetros previamente determinados em toda a área selecionada. Após a indicação da cor, a área de interesse foi desenhada manualmente e solicitado o cálculo da área total e da DOI máxima. Sendo que DOI é o produto entre a densidade óptica média e área marcada.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística utilizada no projeto, exposta nos resultados foi proveniente do software R Core Team Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2019). Para a análise da ultrassonografia, radiografia e microtomografia foram usados os testes Kappa, para a análise de macroscopia foi usado o teste de correlação de Spearman. Ao se comparar em boxplot os diferentes exames pelos escores atribuídos, percebe-se que as pontuações se distribuem de maneira muito semelhantes nos dois membros analisados. O que se pode confirmar através dos Testes T pareado e de Wilcoxon, que não apresentam valor de p significativo.

5. RESULTADOS

Com relação aos dados obtidos dos animais, só foi possível acompanhar o número de corridas e vitórias que o animal participou, não tendo as informações de treinamento, como quantidade, frequência e intensidade.

As imagens obtidas por cada método foram analisadas individualmente a partir do sistema de pontuação previamente determinado para cada técnica de imagem. Cada parâmetro analisado caracteriza os padrões do tecido osteocondral da articulação metacarpofalangeana de equinos PSI em treinamento.

Foi possível observar aspectos morfológicos característicos de cartilagem e osso subcondral, a exemplo que é observado na literatura em exame macroscópico (Figura 6A) e histológico de equinos (McILWRAITH et al., 2010). Com esse estudo obteve-se valores adquiridos através da análise de imagem de oito equinos assintomáticos e, que serve de base para análises dessas características em outros animais de semelhantes atributos.

A partir das imagens obtidas e comparando-as entre si, lesões macroscópicas já podem ser previamente identificadas nos exames radiográficos e ultrassonográficos, dependendo de sua localização. Em todas superfícies articulares encontrou-se lesões de diferentes tipos, graus e magnitudes. Notou-se também uma heterogeneidade de coloração, principalmente na região de maior apoio no centro dos côndilos, além de diferença de espessura de cartilagem hialina, assemelhando-se a necrose tecidual (Figura 6B). Além disso, em alguns animais percebeu-se a rigidez aumentada ou a falta dela no osso subcondral, no momento das biopsias. Em todos os membros analisados foi possível observar macroscopicamente que o côndilo lateral do terceiro metacarpiano é menor em comprimento axial, apesar não terem sido mensurados com qualquer instrumento de medida.

Durante as biopsias ósseas, tivemos mais facilidade em realizar o corte nas cristas sagitais, por se apresentarem mais porosas e menos espessas, sendo a amostra mais facilmente removida do osso. Dentre todos, os que mais se destacaram nesse momento, foi o animal 7 (12,5%) que apresentou as cristas sagitais de ambos os membros mais porosa, sendo necessária pouca força aplicada para biopsia óssea. Inversamente proporcional, nos côndilos mediais do membro torácico direito, 37,5% ou três animais (nº 4, 6 e 7) apresentaram uma maior resistência ao corte com o *punch* metálico. Na retirada das biopsias alguns ossos foram tão resistentes ao corte que acabaram entortando o instrumento metálico de aço inox.

5.1.AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

As pontuações variaram pouco entre os avaliadores, sendo o avaliador três o que forneceu as maiores pontuações. Entre os animais, ao se comparar o membro esquerdo com o direito, não houve diferença estatística. Comparando-se com os outros exames, nota-se também que o exame ultrassonográfico é o que mais se relaciona com o histológico ($p=0,288$) em questão de sensibilidade de características.

Gráfico 1. Gráfico de escores atribuídos a cada membro, por cada avaliador, ao exame ultrassonográfico

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Segundo o quadro 1, dos parâmetros avaliados através do exame ultrassonográfico, os valores poderiam variar de 0, sendo ausência de alteração articular, a soma até 16 pontos. Analisando o gráfico 1, têm-se que o valor de soma mais alto atribuído para o exame ultrassonográfico foi de 10 pontos para o MTE do animal 4 pelo avaliador 3, e o menor valor de zero ponto para o MTE dos animais 3 e 6, e MTD para o animal 1.

Ao avaliar cada parâmetro do quadro 1, temos que 50% das articulações apresentaram irregularidades em ligamentos periarticulares; para 54,2% das articulações observou-se linha de cartilagem bem definida, contínua, lisa e facilmente identificável; 75% apresentaram irregularidades no osso subcondral em relação a superfície e 58,3% em relação a presença de osteófitos.

Para o parâmetro de ligamentos periarticulares segundo a área de origem/inserção, 12,5% dos animais apresentaram irregularidades para os três avaliadores (animal 1), e 37,5% para dois avaliadores (animais 2, 3 e 7), todas no MTE. Para dois avaliadores o animal 6 não tinha alterações segundo essa característica avaliada. Já para o MTD, dois avaliadores observaram proliferação óssea no animal 5, referente a essa mesma característica. Para dois avaliadores, 62,5% dos animais apresentaram irregularidades nos ligamentos periarticulares (2, 3, 4, 6 e 7). O animal 1 foi unânime entre os avaliadores ao mostrar ausência de alterações nos ligamentos periarticulares. Para dois avaliadores o

animal 8 também não apresentou alteração nessa característica. Sendo a pontuação 2 de 4 a maior nessa característica, que equivale a presença de proliferação óssea.

No parâmetro referente a superfície articular segundo a espessura da cartilagem articular, para o membro esquerdo, metade apresentou linha de cartilagem bem definida, contínua, lisa e facilmente identificável (animais 3, 4, 5 e 6). Para dois avaliadores o animal 1 apresentou pontuação equivalente a linha de cartilagem de difícil identificação e porções lisa e contínua em mais de 50% da superfície avaliada. Para o MTD a maior pontuação foi 1 de 4, em que o animal 7 foi avaliado em unanimidade nessa característica. Além desse, os animais 2, 5 e 8 foram avaliados com a mesma pontuação por apenas um dos avaliadores.

Na característica avaliando o osso subcondral segundo a superfície, para o membro esquerdo, a maior pontuação possível, sendo erosão completa, foi do animal 4. A pontuação de superfície irregular foi atribuída para o animal 1 por todos os avaliadores; ao animal 4 por dois avaliadores. Apenas 37,5%, os animais 3, 6 e 7 apresentaram superfície lisa. Para o MTD, a maior pontuação foi para 37,5%, com presença de áreas de depressão, atribuídas aos animais 2, 5 e 7. O animal 1 apresentou escore de discreta irregularidade focal para todos os avaliadores, já os animais 2, 6 e 8 apresentaram essa característica apenas para dois.

No parâmetro de osso subcondral segundo a presença de osteófitos, para o MTE, a maior pontuação foi 3 de 4, sendo com presença de osteófitos, e foi atribuída ao animal 1 por dois avaliadores. Somente os animais 3 e 6 foram avaliados com bordo articular liso por dois avaliadores. Para o MTD, a pontuação máxima também foi 3 de 4 atribuída ao animal 4. Apenas 37,5%, os animais 1, 2 e 5 foram pontuados com pequenas irregularidades focais.

As espessuras articulares também foram mensuradas pelo exame ultrassonográfico e estão dispostas a seguir:

Tabela 2. Valores de espessura cartilaginosa da face articular do terceiro metacarpiano, dos membros torácicos direito e esquerdo, mensurados por ultrassonografia

Animal	Espessura cartilaginosa por ultrassonografia	
	Membro Torácico Direito (mm)	Membro Torácico Esquerdo (mm)
A01 cm	0,59	0,64
A01 cs	0,77	0,67
A01 cl	0,77	0,54
A02 cm	0,74	0,85
A02 cs	0,85	0,85
A02 cl	0,95	1,10
A03 cm	0,64	0,85
A03 cs	0,64	0,85
A03 cl	0,95	1,10
A04 cm	0,85	1,10
A04 cs	0,85	1,20
A04 cl	0,95	0,74
A05 cm	0,64	0,74
A05 cs	0,75	0,53
A05 cl	0,64	0,64
A06 cm	0,75	0,85
A06 cs	0,74	0,74
A06 cl	0,67	1,10
A07 cm	0,64	0,64
A07 cs	0,64	0,74
A07 cl	0,95	0,96
A08 cm	0,95	0,64
A08 cs	0,85	0,53
A08 cl	0,53	0,54

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2018).

Analisando os valores obtidos da tabela 2, para o MTD, observou-se que as espessuras cartilaginosa dos animais 3 e 7 foram idênticas. Os valores da região de côndilo medial foram iguais para os animais 3, 5 e 7, com o valor de 0,64 mm. Os valores para os

côndilos mediais foram de 0,74 e 0,75 mm para os animais 2 e 6, respectivamente. Já na crista sagital, os valores foram de 0,85 mm para os animais 2, 4 e 8, de 0,64 mm para os animais 3 e 7, e de 0,74 e 0,75 mm para os animais 5 e 6, respectivamente. Os valores para o côndilo lateral, os animais 2, 3, 4 e 7 obtiveram 0,95 mm de espessura. As médias para cada região do MTD foram: cm: 0,72 mm; cs: 0,76 mm; cl: 0,80 mm. O valor mais baixo encontrado foi de 0,53 mm para o côndilo lateral do animal 8 (12,5%), e o mais alto foi de 0,95 mm para o côndilo lateral dos animais 2, 3, 4 e 7 (50%), e côndilo medial do animal 8 (12,5%). Metade dos animais apresentaram valores de côndilo medial abaixo da média, bem como 12,5% em relação à crista sagital e 50 % em relação ao côndilo lateral.

Para os membros esquerdos, as espessuras cartilagíneas dos animais 2 e 3 foram idênticas, de cm: 0,85 mm; cs: 0,85 mm e cl: 1,1 mm. Os valores de côndilo medial foram iguais nos animais 1, 7 e 8, de 0,64 mm. Para os animais 5 e 8 o valor foi igual na crista sagital de 0,53 mm, bem como para os animais 6 e 7, de 0,74 mm. Para os animais 1 e 8, os valores para os côndilos laterais foi igual de 0,54 mm. As médias para cada região do MTE foram: cm: 0,78 mm; cs: 0,76 mm; cl: 0,83 mm. A média dos valores de espessura de cartilagem na crista sagital foi igual para os membros direito e esquerdo de 0,76mm.

O valor mais baixo encontrado foi de 0,53 mm para a crista sagital dos animais 5 e 8 (25%) e côndilo lateral do animal 8 (12,5%), e o mais alto foi de 1,2 mm para a crista sagital do animal 4 (12,5%). Metade dos animais apresentaram valores de côndilo medial abaixo da média, bem como 62,5% em relação à crista sagital e 50 % em relação ao côndilo lateral.

A espessura média da cartilagem para côndilo lateral, côndilo medial e crista sagital foi de 0,81; 0,75; 0,74 mm, respectivamente.

5.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E DENSITOMETRIA ÓPTICA

Os resultados obtidos nas pontuações dos exames radiográficos estão no gráfico 2 e a DOR na tabela 3 abaixo.

Gráfico 2. Gráfico de escores atribuídos a cada membro, por cada avaliador, ao exame radiográfico

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Analisando o gráfico 2, nota-se uma discordância entre os avaliadores, sendo o avaliador dois (triângulo) o que forneceu os mais altos escores, sendo 10 pontos pro MTE do animal 2 o valor máximo. Os animais 2 e 5 (25%) receberam o escore mínimo de zero para o MTE e o animal 7 (12,5%) para o MTD.

Segundo o quadro 2, dos parâmetros avaliados através do exame radiográfico, os valores poderiam variar de 0, sendo ausência de alteração articular, até 35 pontos.

Ao avaliar cada parâmetro do quadro 2, temos que 87,5% das articulações não apresentaram diminuição da interlinha radiográfica; para 20,8% das articulações observou-se alguma proliferação óssea, dessas 45,8% compreenderam apenas um dos membros; 66,6% apresentaram nenhuma ou leve esclerose subcondral e 62,5% em relação a osteólise subcondral; apenas 2% apresentou evidência de fragmentos osteocondrais e desses o escore atribuído foi de fragmento menor ou igual a 5mm.

Para o parâmetro de diminuição da interlinha radiográfica para o MTE, apenas os animais 2 e 7 tiveram imagem classificada como suspeita por um avaliador, os demais não apresentaram alteração. No MTD, somente 37,5% (animais 2, 4 e 7) apresentaram alteração suspeita pelo mesmo avaliador, sendo que os outros 62,5% foram avaliados como normais.

Com relação a evidência de osteófitos e/ou proliferações ósseas no MTE, o animal 6 foi avaliado por dois avaliadores com discreta projeção óssea entre as faces ósseas. Para dois avaliadores, o animal 4 apresentou discreta projeção óssea localizada em uma das faces ósseas. Já no MTD, o maior escore foi atribuído por um avaliador para o animal 8,

apresentando projeção óssea proeminente, organizada e localizada (escore 3 de 5). Para dois avaliadores, 37,5% dos animais (5, 6 e 8) apresentaram discreta projeção óssea localizada em uma das faces ósseas.

Com relação à presença de esclerose subcondral, no MTE, o animal 2 obteve pontuação máxima (5 de 5), com evidente esclerose subcondral difusa e estendendo para a trabeculação da epífise para 33,3% dos avaliadores. A pontuação atribuída a presença suspeita ou placa óssea subcondral discretamente mais densa foi unânime para os animais 3 e 6, e para dois avaliadores 50% dos animais (5, 6, 7 e 8) também apresentaram essas características. Avaliando o MTD, os animais 2 e 4 obtiveram a pontuação máxima pelo mesmo avaliador que atribuiu no MTE. Para 37,5% dos animais, as pontuações foram unânimes quando caracterizados como presença suspeita ou placa óssea discretamente mais densa (animais 1, 5 e 6).

A presença de osteólise subcondral foi avaliada, e o MTE do animal 2 apresentou erosão irregular proeminente ou lise cística na margem subcondral com discreta extensão para a epífise (escore 4 de 5). O animal 1 foi classificado por duas vezes com erosão superficial do osso subcondral generalizada. Os animais 6 e 8 para 50% dos avaliadores e o animal 4 por 100%, apresentaram pequenas ondulações na margem subcondral, levemente irregular. No MTD, o animal 5 atingiu a pontuação máxima de severa erosão ou lesão cística estendendo-se pela epífise (escore 4 de 5), para 33,3% dos avaliadores. Metade dos animais foram classificados com pequenas ondulações na margem subcondral levemente irregular (os animais 4, 5, 6 e 7). Na característica evidenciando fragmentos osteocondrais, apenas o animal 2 pontuou no MTD com fragmento único sutil pouco definido e não deslocado.

Os resultados da densitometria óptica radiográfica a partir dos degraus da escala de mm de Alumínio estão expostos na tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Valores de DOR mensurados em cada região do terceiro metacarpiano, demonstrado nos degraus da escala de Alumínio

Animal	<i>Degrau da escala</i>	
	Membro Torácico	Membro Torácico
	Direito	Esquerdo
A01 cm	9,97	9,37
A01 cs	9,00	9,21
A01 cl	9,78	9,50
A02 cm	10,78	10,87
A02 cs	10,74	10,85
A02 cl	10,45	10,00
A03 cm	9,02	10,04
A03 cs	9,00	9,16
A03 cl	9,27	9,91
A04 cm	10,63	10,88
A04 cs	8,53	8,76
A04 cl	10,52	9,83
A05 cm	8,97	10,24
A05 cs	9,13	9,65
A05 cl	8,86	9,71
A06 cm	10,08	10,04
A06 cs	9,37	9,18
A06 cl	10,43	10,11
A07 cm	8,89	9,72
A07 cs	8,05	8,83
A07 cl	9,20	9,90
A08 cm	10,36	10,46
A08 cs	9,14	8,68
A08 cl	10,10	9,75

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

A partir dos dados obtidos na densitometria observa-se que dentre as três regiões analisadas do terceiro metacarpiano, a crista sagital teve a menor densidade óssea em 75%

dos casos, exceto em dois animais (2 e 5). Dois animais, 25% apresentaram densidade óssea do côndilo lateral maior que as outras regiões avaliadas (6 e 7).

Os valores para o MTD dos animais 1 e 3 foram idênticos para a crista sagital, comparando entre si, 37,5% dos animais (2, 4 e 8) apresentaram maiores valores para o côndilo medial; os animais 25% (6 e 7) demonstraram maiores valores para o côndilo lateral; já os restantes 37,5% (1, 3 e 5) não seguiram um padrão definido para os valores.

Para os valores de tendência de DOR, a menor pontuação foi de 8,05 para a crista sagital esquerda do animal 7, e a maior foi de 10,87 para o côndilo medial esquerdo do animal 2. Os valores médios relativos a cada região do MTD foram: cm: 9,88 mm; cs: 9,12 mm; cl: 9,91 mm; e do MTE foram: cm: 10,20 mm; cs: 9,29 mm; cl: 9,83 mm. Os valores médios para cada região foi de 9,20mm para crista sagital, 9,87mm para o côndilo lateral e 10,04mm para côndilo medial.

Ao analisar o membro esquerdo, notou-se que metade dos côndilos mediais apresentaram valores abaixo da média geral, bem como 75% em relação à crista sagital e 37,5% em relação ao côndilo lateral. Quanto ao membro direito, 37,5% apresentaram côndilo medial, 50% na crista sagital e 50% de côndilo lateral com valores abaixo da média.

5.3.AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A partir do teste da correlação de Spearman, podemos notar que há uma correlação direta entre exame radiográfico e ultrassonográfico com o exame macroscópico ($p=0,53$ e $p=0,54$ respectivamente).

Observando o gráfico 3 abaixo nota-se que as pontuações variaram entre 0 e 7,75 na soma geral, seguindo o quadro 2. Dentre os três avaliadores, o que atribuiu notas mais altas foi o avaliador 3 para o MTD do animal 8. Além disso, os valores para ambos os membros foram similares entre si, divergindo nos animais 1 e 8, em que os menores valores foram atribuídos ao MTD e MTE, respectivamente.

Gráfico 3. Dispersão das pontuações da avaliação macroscópica das articulações MCF, pelos diferentes avaliadores

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

No membro esquerdo, para dois avaliadores, o animal 1, com relação à presença de linhas em superfície articular, apresentou mais de cinco linhas parciais ou duas completas de desgaste de espessura/ superfície articular (Figura 6A). Para dois avaliadores, 50% dos animais não apresentaram nada digno de nota (2, 5, 6 e 7). Para o membro direito, para todos os avaliadores, o animal 8, e para dois o animal 2, apresentaram mais de cinco linhas parciais ou mais de duas completas de desgaste/superfície articular. Os animais 5 e 6, ou seja 25%, foram avaliados por duas vezes com uma a duas linhas parciais de desgaste de espessura/superfície articular. Os animais 1 e 7, 25% não apresentaram nada digno de nota segundo dois avaliadores.

Na característica presença de erosões em superfície articular no MTE, 25% dos animais apresentaram erosão completa da superfície articular (2 e 7), já 50% dos animais foram classificados com erosão em espessura parcial maior que cinco mm de diâmetro (1, 2, 3 e 8), e 12,5% foram classificados com erosão em espessura parcial menor que cinco mm de diâmetro (animal 6). Os animais 5 e 7 não apresentaram nada digno de nota. Para o MTD, 25% dos animais, os 7 e 8 apresentaram erosão completa da espessura cartilaginosa, e 37,5% apresentaram erosão parcial menor que cinco mm por dois avaliadores (animais 1, 2 e 3).

Para as lesões osteocondrais no aspecto distal palmar do metacarpiano (artrose palmar), no MTE, os animais 2, 4, 6 e 8, ou 50% foram pontuados com erosão completa da espessura, descoloração púrpura com mais de cinco mm de diâmetro (Figura 6B). Para

37,5% dos animais foram pontuados com erosão parcial por dois avaliadores (1, 4 e 7), já 25% não apresentaram nada digno de nota (3 e 5). Para o MTD, o animal 8 por dois avaliadores e o animal 4 por unanimidade foram pontuados com erosão completa maior que cinco mm. Para 37,5% dos animais foram classificados com erosão parcial menor que cinco mm de diâmetro (1, 3 e 7) e outros 37,5% não apresentaram nada digno de nota (2, 3 e 5).

Na figura 6 é possível observar essas linhas de desgaste e artrose palmar (Figura 6A), além de descoloração e erosão completa com mais de cinco mm de diâmetro.

Figura 6. (A) Articulação MCF seccionada e aparente superfície articular do osso terceiro metacarpiano; revelando lesões em linha de desgaste nos côndilos do metacarpiano; (B) e detalhe de artrose palmar com descoloração púrpura em côndilo medial, no espaço onde foi removido o fragmento para avaliação nota-se o adelgaçamento da cartilagem hialina **M**: côndilo medial

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2018).

5.4. MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (Micro-TC)

Os escaneamentos para as microtomografias computadorizadas foram realizados em todas as amostras e as imagens foram reconstruídas através do *software* NRecon® do próprio aparelho Skyscan 1176 do IB. A partir dessas imagens é que foi realizado o processamento pelo *software* CTAnalyser versão 1.17.7.2 (64 bits).

Utilizando as ferramentas do *software* foi possível obter os dados da tabela 5. Com a imagem na tela, o meio do fragmento foi medido, selecionando as duas extremidades: *top* e *bottom* (destaque azul na figura 7). Com a opção *Selection* destacou-se a imagem que representava o centro da amostra, e a partir dessa imagem obteve-se as avaliações das características do fragmento.

Figura 7. Interface do software CTAn evidenciando como foi realizada a mensuração do meio do fragmento (retângulo azul). As setas laranjas mostram que cada metade do fragmento está para cada lado no tubo Falcon

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Algumas medidas, como comprimento do fragmento e espessura da cartilagem também foram realizadas e tabuladas (Tabela 4). Para facilitar a visualização e mensuração da cartilagem articular, a opção *Color 2* foi selecionada, a qual evidencia a região cartilaginosa (Figura 8), tornando possível sua mensuração.

Figura 8. Software CTAn no modo Color 2 (círculo vermelho a direita) para destacar e evidenciar a cartilagem articular do fragmento (círculo branco na tela) pra posterior mensuração da espessura

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Após mensuradas as metades do fragmento, espessura de cartilagem e ROI, a imagem foi binarizada com a opção de *threshold* automático do *software* para cada fragmento, e algumas medidas foram fornecidas a partir disso (Tabela 5).

Na tabela 4 estão dispostos os valores obtidos no CTAn, mensurando o comprimento total do fragmento e a espessura da cartilagem (mínima e máxima) da mesma amostra. Essa análise foi realizada após feitas as configurações descritas acima.

Tabela 4. Valores numéricos obtidos a partir do CTAn para cada região avaliada do terceiro metacarpiano, abrangendo comprimento da biopsia óssea e espessura da sua cartilagem

<i>Animal</i>	<i>Comprimento (mm)</i>	<i>Espessura cartilagem (mm)</i>
01 D cm	2,479	0,172-0,223
01 D cs	2,578	0,213-0,270
01 D cl	4,55	0,286-0,324
01 E cm	3,118	0,172-0,204
01 E cs	2,557	0,165-0,246
01 E cl	4,100	0,139-0,204
02 D cm	3,075	0,133- 0,179
02 D cs	4,244	0,140-0,172
02 D cl	3,905	0,144-0,165
02 E cm	5,180	0,220-0,237
02 E cs	3,963	0,174-0,195
02 E cl	5,506	0,156-0,208
03 D cm	3,59	0,103-0,186
03 D cs	1,9	0,117-0,201
03 D cl	4,46	0,348-0,407

<i>Animal</i>	<i>Comprimento (mm)</i>	<i>Espessura cartilagem (mm)</i>
03 E cm	3,60	0, 272-0,300
03 E cs	8,76	0,259-0,267
03 E cl	3,52	0,140-0,172
04 D cm	1,554	0,150-0,223
04 D cs	3,574	0,078-0,156
04 D cl	3,701	0,208-0,238
04 E cm	2,64	0,164-0,218
04 E cs	2,432	0,102-0,133
04 E cl	3,935	0,172-0,188
05 D cm	2,373	0,180-0,312
05 D cs	2,726	0,174-0,192
05 D cl	1,933	0,156-0,164
05 E cm	1,869	0,133-0,174
05 E cs	2,167	0,122-0,126
05 E cl	1,886	0,140-0,158
06 D cm	2,322	0,212-0,277
06 D cs	3,517	0,223-0,268
06 D cl	2,601	0,195-0,262
06 E cm	3,530	0,234-0,246
06 E cs	2,504	0,158-0,226
06 E cl	1,939	0,240-0,305

<i>Animal</i>	<i>Comprimento (mm)</i>	<i>Espessura cartilagem (mm)</i>
07 D cm	2,114	0,139-0,246
07 D cs	2,801	0,157-0,165
07 D cl	3,546	0,117-0,156
07 E cm	3,530	0,176-0,201
07 E cs	3,480	0,199-0,260
07 E cl	3,513	0,131-0,218
08 D cm	2,772	0,157-0,174
08 D cs	4,372	0,136-0,149
08 D cl	2,792	0,149-0,172
08 E cm	4,025	0,245-0,301
08 E cs	3,220	0,223-0,281
08 E cl	2,361	0,140-0,188

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Como observado nas biopsias ósseas, pode-se inferir que 43,75% dos côndilos mediais tiveram comprimento menor (Tabela 4), uma vez que não era possível o corte mais profundo com o *punch* metálico. Da mesma forma, nota-se que 43,75% das cristas sagitais apresentaram maior comprimento por facilidade no corte, sendo o maior valor de 8,76mm analisando todos os fragmentos. A espessura das cartilagens não apresentou significância estatística correlacionado com o comprimento da amostra.

Análise morfométrica como densidade mineral óssea, área óssea da amostra, porosidade, separação e tamanho de trabéculas foram processados pelo programa e estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5. Valores numéricos obtidos a partir do CTAn para cada região avaliada do terceiro metacarpiano, abordando densidade mineral óssea, Hounsfield, razão entre área óssea da amostra e total (BAr/TAr), separação (Tb.Sp) e número de trabéculas ósseas (Tb.Th) e número de trabéculas por mm de tecido (Tb.N). Voxels é a quantidade de cortes feitos e reconstruídos pelo *software*

Animal	Densidade mineral óssea	Voxels	Hounsfield Unidades	BAr/TAr (%)	Tb.Sp (mm)	Tb.Th (mm)	Tb.N (1/mm)
01 D cm	0,722	28965	925,535	87,471	0,073	0,511	1,710
01 D cs	0,569	19608	730,197	61,043	0,157	0,247	2,470
01 D cl	0,612	36118	785,219	80,852	0,090	0,380	2,123
01 E cm	0,632	35565	810,667	73,080	0,106	0,290	2,518
01 E cs	0,701	27426	899,800	85,865	0,065	0,398	2,155
01 E cl	0,623	29086	799,937	58,735	0,155	0,221	2,648
02 D cm	0,641	27950	822,173	65,790	0,130	0,251	2,618
02 D cs	0,622	37973	797,976	79,616	0,117	0,457	1,739
02 D cl	0,650	34397	833,936	69,931	0,1263	0,293	2,380
02 E cm	0,657	40208	843,326	78,185	0,105	0,378	2,068
02 E cs	0,642	38359	824,088	81,241	0,102	0,445	1,824
02 E cl	0,677	44444	868,956	86,232	0,082	0,518	1,661
03 D cm	0,706	20240	906,249	80,496	0,103	0,428	1,879
03 D cs	0,474	15192	608,491	60,383	0,156	0,238	2,534
03 D cl	0,616	36646	790,711	81,768	0,082	0,370	2,208
03 E cm	0,635	39836	814,945	76,760	0,111	0,367	2,092
03 E cs	0,579	37312	740,301	67,772	0,135	0,285	2,372
03 E cl	0,653	31281	837,492	67,174	0,154	0,316	2,123
04 D cm	0,646	15147	828,625	85,187	0,069	0,401	2,121
04 D cs	0,602	26368	773,227	58,127	0,174	0,241	2,402
04 D cl	0,636	30431	816,221	75,225	0,138	0,421	1,785
04 E cm	0,682	29398	875,436	85,865	0,084	0,512	1,675
04 E cs	0,614	19084	788,426	56,434	0,191	0,247	2,277
04 E cl	0,668	34519	857,537	74,726	0,110	0,328	2,277
05 D cm	0,566	20548	727,169	73,001	0,128	0,347	2,103
05 D cs	0,612	28733	785,443	78,109	0,111	0,398	1,958
05 D cl	0,617	25393	791,987	85,507	0,084	0,498	1,716

Animal	<i>Densidade mineral óssea</i>	<i>Voxels</i>	<i>Hounsfield Unidades</i>	<i>BAr/TAr (%)</i>	<i>Tb.Sp (mm)</i>	<i>Tb.Th (mm)</i>	<i>Tb.N (1/mm)</i>
05 E cm	0,623	21113	799,342	84,793	0,075	0,422	2,008
05 E cs	0,618	23885	792,812	78,853	0,108	0,405	1,946
05 E cl	0,604	22048	775,484	84,451	0,091	0,495	1,703
06 D cm	0,608	8870	779,927	75,394	0,099	0,305	2,470
06 D cs	0,522	25732	670,239	64,214	0,155	0,278	2,304
06 D cl	0,647	27212	830,499	82,068	0,092	0,422	1,942
06 E cm	0,649	33024	833,050	81,953	0,086	0,393	2,081
06 E cs	0,538	20662	691,015	58,863	0,185	0,265	2,213
06 E cl	0,670	18160	860,107	88,049	0,062	0,462	1,902
07 D cm	0,334	26422	430,033	84,238	0,083	0,448	1,879
07 D cs	0,283	19930	364,571	55,130	0,218	0,268	2,053
07 D cl	0,315	32960	406,456	72,681	0,124	0,331	2,195
07 E cm	0,341	31733	438,930	80,321	0,103	0,420	1,908
07 E cs	0,286	31377	368,751	66,474	0,169	0,335	1,979
07 E cl	0,340	30969	438,025	79,684	0,088	0,347	2,294
08 D cm	0,387	29764	497,482	83,565	0,087	0,443	0,188
08 D cs	0,291	21869	374,752	53,528	0,194	0,224	2,385
08 D cl	0,404	29969	520,354	85,579	0,077	0,459	1,860
08 E cm	0,437	11699	562,273	28,172	0,156	0,061	4,585
08 E cs	0,292	18955	376,136	64,567	0,152	0,277	2,325
08 E cl	0,373	24331	480,241	82,023	0,087	0,397	2,065

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Com a análise estatística dos dados acima foi possível obter os gráficos 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

Analisando o gráfico 4, percebe-se que houve pouca variação entre um membro e outro, exceto pelo animal 3, em que o membro direito apresentou uma maior amplitude de valores entre as regiões (cm, cs e cl). Os membros torácicos direitos dos animais 1 e 3 apresentaram maiores valores de densidade óssea na microtomografia, seguindo um mesmo padrão de crista sagital com menor valor, seguido por côndilo medial e côndilo lateral com maior valor.

Gráfico 4. Dispersão dos valores de densidade mineral óssea, dos articulações MCF direita e esquerda, em suas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral)

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

No gráfico 4 de densidade mineral óssea, ambos os membros se comportaram de formas semelhantes, com valores similares, com exceção dos animais 1 e 3, em que o MTD recebeu pontuações extremas entre os avaliadores. A média dos valores obtidos nessa avaliação foram de 0,515 para crista sagital, 0,569 para côndilo lateral e 0,579 para côndilo medial.

O gráfico 5 comporta-se similar ao gráfico 4. Isso se deve ao fato de ambos serem medidas de densidade, contudo a HU é uma medida mais refinada e específica de tomografia computadorizada.

Gráfico 5. Dispersão dos valores de Unidades de Hounsfield (HU) da microtomografia, para as articulações MCF nas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral)

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

O gráfico 6 apresenta certa uniformidade entre os valores de área óssea. A faixa de valores de 53 a 88% de área óssea, exceto o MTE do animal 8 que atingiu o valor mínimo de 28,17% e sendo a mediana de 78,14%.

Gráfico 6. Dispersão dos valores de BAR/TAr, razão entre a área óssea do fragmento (BAR) sobre a área total (TAr) da microtomografia, das articulações MCF em suas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral)

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

No gráfico 7 destaca-se a disparidade entre a separação óssea dos membros torácicos do animal dois, apresentando valores bem distintos entre si.

Gráfico 7. Dispersão dos valores de separação trabecular (Tb.Sp) da microtomografia, para as articulações MCF nas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral)

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

No gráfico 8, que compara a espessura trabecular das amostras observou-se que para 50% dos animais o côndilo lateral apresentou maiores valores.

Gráfico 8. Dispersão dos valores de espessura de trabéculas ósseas (Tb.Th) da microtomografia, para as articulações MCF nas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral)

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Estatisticamente foi possível observar que o número de trabéculas ósseas (Gráfico 9) foi similar para todos os animais e entre os membros.

Gráfico 9. Dispersão dos valores de número de trabéculas ósseas por mm de tecido (Tb.N) da microtomografia, para as articulações MCF nas diferentes regiões do metacarpiano (cm: côndilo medial; cs: crista sagital; cl: côndilo lateral)

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Quando comparados os valores de DOR e Densidade Mineral Óssea avaliado por micro-TC, a crista sagital foi o valor mais baixo em 75% dos animais. Quando confrontados os valores entre os membros direito e esquerdo, para 100% dos animais os valores do MTD foi maior que o MTE na micro-TC, na escala DOR apenas 62,5% desses valores concordaram com essa afirmação.

5.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Para essa modalidade de exame muniu-se de duas técnicas, a padrão com Hematoxilina & Eosina e a de Azul de Toluidina. Cada uma será descrita separadamente a seguir.

5.5.1. HEMATOXILINA & EOSINA

Assim como visto nos exames radiográfico e ultrassonográfico, o exame histológico teve um avaliador que destoou levemente dos outros dois (gráfico 10), nesse caso o avaliador 2. Porém, é possível observar que a faixa de pontuação permaneceu entre 15 a 40 pontos, referentes ao quadro 5 e 6. Os animais 6 e 8 obtiveram os escores mais altos para o MTD e MTE, respectivamente.

Gráfico 10. Dispersão dos escores obtidos de cada articulação MCF do equinos, por cada avaliador

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Houve uma tentativa de marcação da região dorsal e lateral no fragmento de biopsia, porém, a tinta da caneta utilizada se dissolveu com o uso do paraformaldeído, e quando retirou-se as amostras para realizar a histologia, já não estava presente a marcação.

Seguindo o quadro 5 de avaliação, os valores variaram de 0 a 16 pontos, por membro (esquerdo e direito) e por região (côndilos e crista). Dessa forma, foram três avaliadores analisando dois membros com três regiões cada, os valores poderiam atingir até 288 pontos. O valor máximo foi do animal 8 com 102 pontos, e o animal 7 com a menor pontuação de 60.

Para os valores de pontuação atribuídos pelos avaliadores para os parâmetros focados na cartilagem articular, para dois avaliadores o membro esquerdo do animal 8 apresentou fissuras na zona profunda (escore máximo), e para ambos o animal 3 apresentou fissuras na zona superficial no côndilo medial do MTE. Para a crista sagital, o animal 8 também foi pontuado com fissuras na zona profunda; o animal 1 foi pontuado por dois avaliadores com fissuras na zona superficial. Para o côndilo lateral, o animal 8 também pontuou por dois avaliadores com fissuras na zona profunda (escore máximo); 25% dos animais pontuaram com fissuras na zona média da cartilagem (1 e 3), sendo que 50 % não apresentaram alteração na superfície articular para dois avaliadores (animais 4, 5, 6 e 7).

Ainda no parâmetro de fissuras em cartilagem, para o membro torácico direito, o animal 7 pontuou com escore 2 de 4, apresentando fibrilação na zona média e 25% apresentaram em zona superficial de côndilo medial (animais 2 e 4). Para a crista sagital do MTD, o animal 1 apresentou fissuras até a zona média, o animal 3 apresentou por duas vezes fissuras em zona superficial. No côndilo lateral, o animal 2 foi pontuado por duas vezes com fissuras na zona profunda, o animal 1 por duas vezes foi pontuado com fissuras na zona superficial.

Analisando o parâmetro de perda focal de células para o MTE, o animal 8 obteve pontuação máxima pro côndilo medial, com perda de 20 a 30% de células por campo de objetiva de 40x; o animal 1, por unanimidade, e os animais 6 e 7 por duas vezes, apresentaram perda de 10 a 20% de células por campo, ou seja, 37,5% apresentaram até 20% de perda celular no côndilo medial. Para a crista sagital, dois avaliadores pontuaram o animal 3 com perda de 20 a 30 % de células por campo; já para 50% tiveram de 10 a 20 % de perda celular nessa região (1, 2, 6 e 7). Para o côndilo lateral do MTE, o animal 4 teve pontuação de perda celular de 20 a 30%; os animais 1, 3 e 8, ou seja, 37,5% tiveram

perda celular de 10 a 20% segundo os avaliadores. Para o MTD, no côndilo medial, o animal 8 foi pontuado com perda celular de 20 a 30% por campo; os animais 1, 2 e 3 foram pontuados por duas vezes com perda de 10 a 20% de células por campo. Para a crista sagital, 62,5% dos animais foram avaliados por duas vezes com perda celular de 20 a 30% por campo (2, 4, 5, 6 e 8), já outros 25% dos animais apresentaram perda focal de apenas 10 a 20% de células por campo por dois avaliadores (1 e 3). No côndilo lateral, o animal 2 teve dois avaliadores a pontuá-lo com perda focal de mais de 50% de área sem células (escore máximo), os animais 4 e 5 foram pontuados por unanimidade com perda celular de 10 a 20% por campo avaliado.

Para o parâmetro de necrose de condrócitos, para o membro esquerdo no côndilo medial, 50% foram pontuados com apenas uma célula necrótica perto da superfície articular (1, 3, 4 e 8). No membro direito, para o côndilo medial, o animal 7 pontuou com escore de uma a duas células necróticas perto da superfície articular, 50% dos animais mostraram de uma a duas células necróticas perto da superfície articular (1, 3, 6 e 8). Para a crista sagital, o animal 5 mostrou para dois avaliadores a presença de duas a três células necróticas perto da superfície articular, o animal 3 por unanimidade, e os animais 1, 2, 7 e 8 para dois avaliadores, ou seja 62,5% pontuaram com escore de apenas uma célula necrótica perto da superfície articular. Para o côndilo lateral, para dois avaliadores, os animais 2 e 6 apresentaram de dois a quatro células necróticas perto da superfície articular, os animais 4 e 7 apresentaram somente uma célula necrótica.

Para o parâmetro de formação de aglomerado de condrócitos, para o membro torácico esquerdo, no côndilo medial, os valores foram variados entre os avaliadores, mas dois concordaram que os animais 2, 6 e 8, 37,5% apresentaram dois condrócitos na mesma lacuna no aspecto superficial da secção da cartilagem articular. Para a crista sagital, o animal 2 foi unânime e para os animais 5 e 7 por duas vezes apresentaram dois condrócitos na mesma lacuna no aspecto superficial da secção da cartilagem articular. Para o côndilo lateral, o animal 1 teve de dois a três condrócitos na mesma lacuna no aspecto superficial da secção da cartilagem articular, pontuados pelos três avaliadores; o animal 2 apresentou dois condrócitos na mesma lacuna no aspecto superficial da secção da cartilagem articular. Para o MTD, no côndilo medial o animal 1 teve duas pontuações máximas com mais de quatro condrócitos na mesma lacuna no aspecto superficial; o animal 5 apresentou de dois a três e o animal 4 apenas dois condrócitos. Para a crista sagital, o animal 6 teve dupla pontuação com dois a três condrócitos por lacuna, 37,5% pontuaram com dois condrócitos na mesma lacuna no aspecto superficial da secção da cartilagem articular (5,

7 e 8). Para o côndilo lateral, o animal 2 por duas vezes teve pontuação máxima de mais quatro condrócitos na mesma lacuna no aspecto superficial, 25% pontuaram com dois a quatro condrócitos na mesma lacuna (1 e 6) e 37,5% não apresentaram aglomerado formado de condrócitos (animais 4, 7 e 8).

Nenhum dos animais apresentou escore zero para todos os parâmetros avaliados,

Seguindo o quadro 6 de avaliação, os valores variaram de 0 a 12 pontos, por membro (esquerdo e direito) e por região (côndilos e crista). Dessa forma, foram três avaliadores analisando dois membros com três regiões cada, os valores poderiam atingir até 216 pontos. O valor máximo foi do animal 1 com 96 pontos, e o animal 3 com a menor pontuação de 53.

No quadro 6, os avaliadores pontuaram os animais para os diversos parâmetros expostos. Para o membro esquerdo, 62,5% dos animais foram pontuados por duas vezes com escore de leve ruptura da matriz óssea subcondral, sendo eles os 1, 2, 4, 5 e 8. Para a crista sagital, o animal 3 foi pontuado com grave ruptura de matriz óssea (escore máximo), já os animais 5 e 6 apresentaram leve ruptura. Analisando o côndilo lateral, para um avaliador, os animais 1 e 5 apresentaram o escore mais alto de grave perda de tecido osteocondral, deixando úlcera; 50% dos animais pontuaram com escore de leve ruptura osteocondral nessa região (4, 6, 7 e 8). No MTD, no côndilo medial, para um avaliador 37,5% apresentaram grave ruptura óssea (1, 7 e 8), os animais 2 e 6 por três vezes e o animal 5 por duas vezes tiveram escore de leve ruptura de matriz óssea, os 25% restantes não apresentaram alteração. Na crista sagital, para um avaliador o animal 3 teve o escore mais alto de grave perda de tecido osteocondral, o animal 6 por duas vezes apresentou escore de colapso completo do tecido osteocondral, o animal 1 apresentou grave ruptura, e o animal 2 por unanimidade pontuou com leve ruptura da matriz osteocondral. Para o côndilo lateral, os animais 1, 2, 4 e 5 apresentaram o escore mais alto de grave perda tecidual, o animal 6 mostrou colapso completo para dois avaliadores, o animal 5 mostrou leve ruptura da matriz óssea subcondral.

No parâmetro de remodelamento ósseo, para o côndilo medial do MTE, os animais 2, 4 e 5 apresentaram escore de avanço do osso subcondral na camada de cartilagem calcificada sem atravessar o *tide*mark, o animal 3 não apresentou alterações aparentes para todos os avaliadores. Para a crista sagital, os animais 1 e 8 apresentaram avanço do osso subcondral na camada de cartilagem calcificada sem atravessar o *tide*mark, o animal 6 apresentou algumas irregularidades no osso subcondral. Para o côndilo lateral, para um avaliador os animais 1, 5, 7 e 8 mostraram escore mais alto de avanço do osso subcondral

através da camada de cartilagem calcificada atingindo a *tidemark*; os animais 1, 4 e 5 apresentaram escore de avanço do osso subcondral na camada de cartilagem calcificada sem atravessar o *tidemark*, e o animal 6 teve algumas irregularidades no osso subcondral. Já para o MTD, no côndilo medial, os animais 2, 5 e 7 apresentaram avanço do osso subcondral na camada da cartilagem calcificada; para um dos avaliadores nenhum animal apresentou alterações aparentes de remodelamento ósseo nessa região. Para a crista sagital, o animal 2 apresentou avanço do osso subcondral através da cartilagem calcificada, e para o mesmo avaliador anterior essa região também não apresentou alterações aparentes. Para o côndilo lateral, 62,5% apresentaram escore máximo para um avaliador (animais 1, 2, 4, 5 e 6); o animal 2 apresentou avanço do osso subcondral na camada da cartilagem calcificada por dois avaliadores; o animal 5 demonstrou algumas irregularidades, e já 25% não apresentaram alterações aparentes (3 e 8).

No parâmetro de divisão osteocondral, no côndilo medial do MTE, o animal 8 apresentou fragmentos e debris dentro da divisão osteocondral; os animais 1 e 5 apresentaram por duas vezes lesões lineares simples com envolvimento do *tidemark* e osso subcondral, bem como o animal 2, porém sem o envolvimento da *tidemark*; 25%, os animais 3 e 4 não apresentaram lesões aparentes. Para a crista sagital, houve discordância entre os escores dos avaliadores, porém, dois acreditam que 50% não apresentaram alteração aparente nessa região (1, 2, 3 e 4). Na avaliação do côndilo lateral também houve pouca concordância entre os escores dos avaliadores; para dois avaliadores o animal 8 teve lesões lineares com envolvimento do osso subcondral e os animais 3 e 6 não apresentaram lesões aparentes. Para o MTD, no côndilo medial, o animal 8 apresentou escore com presença de fragmentos e debris dentro da divisão para dois avaliadores, os animais 1, 2 e 4 apresentaram lesões lineares simples também para dois avaliadores; os animais 3, 5 e 6 não apresentaram alterações. Para a crista sagital, o animal 7 apresentou fragmentos dentro da divisão osteocondral; os animais 2 e 8 apresentaram lesões lineares simples. Para o côndilo lateral, o animal 1 teve escore mais alto segundo dois avaliadores com envolvimento da cartilagem articular e deslocamento de fragmentos de cartilagem calcificada; os animais 4 e 6 apresentaram lesões simples com envolvimento do *tidemark*; e para dois avaliadores os animais 3 e 8 não apresentaram lesões aparentes.

5.5.2. AZUL DE TOLUIDINA

Para essa técnica usou-se os processos iniciais igualmente utilizados para a técnica acima, diferenciando apenas no momento da coloração.

A avaliação das lâminas foi realizada por veterinária especialista na área de patologia. Com o auxílio de um *software* Image Pro-Plus® para medir densidade e concentração de coloração é que se obtiveram os resultados numéricos que estão dispostos nos gráficos 11, 12, 13 e 14.

Na figura 9, microfotografia do corte histológico com a coloração de azul de Toluidina, evidencia as zonas de cartilagem calcificada e não calcificada. A região superior com coloração roxa, que por sequência varia em gradiente de azul na parte inferior, é composta pela superfície cartilaginosa, já a parte inferior desbotada é o osso subcondral. O gradiente de cores varia dependendo da quantidade de proteoglicanos e glicosaminoglicanos.

Figura 9. Microfotografia da lâmina corada com Azul de Toluidina, evidenciando as regiões da cartilagem com proteoglicanos que absorveram o corante (gradiente de azul). A região distal é o osso subcondral que não cora com esse pigmento

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

O desenho manual da área foi necessário para excluir regiões de borda e com imperfeições que poderiam prejudicar o resultado final. A escolha da DOI máxima como parâmetro ideal ocorreu devido ao fato do desvio entre as densidades influenciar a média geral de tal forma, que o valor médio final não representava as diferenças observadas. A DOI máxima corresponde à área máxima analisada, ou seja, à maior área com a maior densidade, sendo um valor mais fiel ao representado no tecido.

No gráfico 11, em que se avalia a quantidade de coloração da amostra, e dessa forma, a quantidade de proteoglicanos presentes, nota-se um pico no membro esquerdo do animal 01, chegando a quase 2000×10^5 . O outro animal que obteve valores mais altos foi o animal 5, principalmente no côndilo lateral. Os gráficos que seguem analisam separadamente as variáveis segundo essa técnica de histologia.

Gráfico 11. Comportamento dos valores de Densidade Óptica Integrada em relação às regiões do terceiro metacarpiano, entre os animais

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

No gráfico 12, seguem as médias dos valores para o azul de Toluidina, avaliados por DOI máxima. Pode-se notar que no MTD o côndilo lateral foi o que mais corou com valor de $445,14 \times 10^5$, seguido do côndilo medial $431,39 \times 10^5$ e por último a crista sagital $415,94 \times 10^5$.

Gráfico 12. Médias dos valores de DOI para cada região do metacarpiano para o membro torácico direito, segundo a coloração de Azul de Toluidina

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

No gráfico 13, o padrão observado foi diferente do gráfico 12, sendo a crista sagital a região a apresentar maiores valores médios e ambos os côndilos com valores parecidos de $507,57 \times 10^5$ o medial e $513,58 \times 10^5$ o lateral. Sendo que os valores atingidos foram maiores, com valor máximo de $728,96 \times 10^5$ para a crista sagital.

Gráfico 13. Médias dos valores de DOI para cada região do metacarpiano para o membro torácico esquerdo, segundo a coloração de Azul de Toluidina

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Observando o gráfico 14, temos que a crista sagital avaliada dentre os dois membros foi a que obteve maiores valores de DOI, seguido pelo côndilo lateral. Esse padrão foi o mesmo observado no gráfico 13, do membro esquerdo.

Gráfico 14. Média geral dos valores de DOI diferenciados por região avaliada do terceiro metacarpiano

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Para o gráfico 14 têm-se que o valor médio da crista sagital foi de 572,45% o mais alto dos três, seguido pelo côndilo lateral com 481,64% e o côndilo medial com 469,48%.

5.6. OCORRÊNCIA DE LESÕES

Os gráficos abaixo exploram a diferença estatística entre os escores de lesão nos diferentes locais de coleta da cartilagem. O primeiro gráfico (Gráfico 15) explora a severidade das lesões por escore, e o segundo (Gráfico 16) a severidade dos escores totais dos animais.

É possível notar pelo gráfico 15 que as lesões se distribuem de maneira bastante semelhante e, embora haja alguma variação, não houve diferença estatística entre os escores dos animais.

Gráfico 15. Boxplot de comparação entre os escores nos diferentes locais de lesão e os escores atribuídos a esses locais

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

No gráfico 16, para o côndilo lateral os escores foram mais altos, incluindo três *outliers*. Na crista sagital houve diferença entre os quartis, e puxando a mediana para cima, no terceiro quartil (75%).

Gráfico 16. Boxplot de comparação entre os escores nos diferentes locais de lesão, nos diferentes animais

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

Ao se comparar as avaliações por pontuações, encontrou-se grande discrepância entre os avaliadores nos diferentes testes, e em alguns animais havendo concordância entre dois e diferença com o terceiro.

Gráfico 17. Boxplot comparando os diferentes exames pela visão dos diferentes avaliadores

Fonte: MARSIGLIA, M. F. (2019).

O gráfico 17 se propõe a avaliar o comportamento geral dos avaliadores. Através dos boxplots podemos verificar a dispersão das avaliações e inferindo sobre a replicabilidade dos resultados. Percebe-se que os escores são mais homogêneos na macroscopia e no ultrassom, e o avaliador 3 atribui notas sistematicamente maiores que os outros dois. No exame radiográfico percebe-se que o avaliador 2 possui uma dispersão maior dos seus escores. Os exames que mais diferiram entre os avaliadores foi o de exame macroscópico e radiográfico, ao se comparar pelos gráficos de boxplot.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo utilizou-se membros torácicos de equinos PSI que passaram pelo mesmo processamento de congelamento e descongelamento. Suspeitava-se que a utilização de peças anatômicas congeladas poderia prejudicar as avaliações histológicas por se tratar de um estudo feito com cartilagem, que é composta grande parte por água, e o congelamento formar cristais de gelo entre a matriz celular. No entanto, para todo processamento de imagens ocorrer de forma sequencial e ordenada essa medida foi necessária. Isso se deve ao fato de que as necropsias do Jockey Club ocorriam em horários imprevisíveis, e muitas vezes não sendo possível a coleta das imagens com a peça fresca. Na literatura, um estudo foi feito avaliando cartilagem e osso subcondral de potros de 17 meses, em até 30 minutos da eutanásia, e notaram alta viabilidade de condrócitos, objetivo do estudo (DYKGRAAF et al., 2008). Já no estudo de Boyde e Firth (2004) as amostras de histologia foram obtidas em até duas horas após eutanásia e estocadas em freezer -20°C sem prejuízo ao tecido cartilaginoso analisado, com presença de condrócitos normais (BOYDE; FIRTH, 2004), enquanto que no de Brama (2000) a coleta foi em até 4 horas da eutanásia, também sem danos ao tecido cartilágneo. Para Turley et al (2014), após a eutanásia dos equinos, as peças permaneceram em freezer de -20°C até o processamento das imagens e não identificaram danos (TURLEY et al., 2014). Utilizando esses trabalhos como base notamos que é comum o uso de cartilagem estocada em freezer -20°C para análises posteriores sem o prejuízo do material como rompimento de condrócitos ou ressecamento da cartilagem.

A velocidade de congelamento influencia tanto a localização quanto no tamanho e quantidade dos cristais de gelo formados. Em altas taxas de congelamento, ocorre a formação de pequenos cristais de gelo e em grande quantidade, com mínimo deslocamento de água, sendo que a aparência do produto congelado, após o descongelamento, é similar ao produto não congelado (COLLA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2003).

Os exames de imagem, como observado na análise estatística, são totalmente dependentes do operador e do avaliador dessas imagens (HINZ; FISCHER JR, 2011). Em nosso estudo, os avaliadores escolhidos foram médicos veterinários com experiência na área, na intenção de haver maior homogeneidade e menor subjetividade nos resultados. Entretanto, notou-se uma variação significativa de pontuação de uma mesma tabela de

características. Isso pode ser devido ao fato de não ter tido um treinamento prévio de consenso entre os avaliadores, uma vez que a análise em tela difere daquela realizada na rotina clínica. Os sistemas de pontuação semiquantitativas são notórios por terem uma interpretação específica do leitor. Em seu estudo com histologia, Hoemann (2011) demonstrou que entre três leitores independentes, a concordância entre leitores e intra leitores é bastante baixa. Portanto, para buscar a maior objetividade em um estudo, é aconselhável que as avaliações histológicas sejam realizadas por 2 ou 3 leitores ocultos independentes. Quaisquer grandes discrepâncias entre os leitores, ou seja, diferenças maiores que 30% na escala de 100 pontos ou diferenças de 2 números ordinais na escala de 0 a 3 pontos, devem ser acordadas em uma reunião de consenso, enquanto as amostras ainda estão sem avaliação. O conjunto final de dados para análises estatísticas pode ser calculado para todos os leitores, onde as pontuações de consenso não são necessárias, ou expresso como uma pontuação de consenso (HOEMANN et al., 2011).

A estatística nos mostrou que o exame radiográfico não está tão intimamente ligado ao exame ultrassonográfico, como esperávamos. Diferentemente do que reportado por Machado et al (2016) que utilizou esses exames juntamente com a tomografia computadorizada e defende o uso das diversas modalidades de imagem como complementares. Hinz e Fischer (2011) observaram em seu estudo que a ultrassonografia teve uma precisão de 82,9% em comparação com 62,2% na radiografia ($P < 0,0001$). A sensibilidade geral para exames ultrassonográficos foi de 91,4% (intervalo de confiança de 95%, IC: 88,8-94,1%) e a especificidade foi de 26,2% (IC de 95%: 15,5-36,8%). A sensibilidade geral à radiografia foi de 66,7% (IC95%: 62,3-71,2%) e a especificidade foi de 33,8% (IC95%: 22,3-45,4%). As projeções radiográficas não revelam defeitos condrais e as alterações ósseas subcondrais podem não ser detectadas. Isso pode ser atribuído à baixa sensibilidade radiográfica, ao período latente radiográfico ou à superposição frequente de estruturas ósseas (HINZ; FISCHER JR, 2011). Para Hinz e Fischer (2011) o uso da ultrassonografia para a imagem das superfícies articulares das articulações, particularmente a cartilagem articular e a interface óssea subcondral, está bem estabelecido. As varreduras em orientação transversal e longitudinal permitem imagens separadas das estruturas, proporcionando uma avaliação mais minuciosa e precisa. Onde os achados radiográficos estão ausentes ou são ambíguos, a ultrassonografia deve ser considerada como uma ferramenta diagnóstica sensível (HINZ; FISCHER JR, 2011).

Ao se comparar os achados de ultrassonografia com a radiografia, notou-se que a primeira foi um exame mais sensível, identificando alterações antes de aparecerem na radiografia. Isso corrobora com Raser et al (2007) , que relata que alterações iniciais foram melhor e mais precocemente detectadas pela ultrassonografia, e sua aplicação clínica para exame das claudicações com origem na articulação MCF pode revelar lesões não aparentes radiograficamente (RASERA et al., 2007).

A escala de Hounsfield (HU) obtida nos animais desse projeto variou de 364,6 até 925,5 HU, sendo 50% dos valores maiores para os côndilos mediais quando comparados por região. Não houve diferença entre os côndilos mediais e laterais quando avaliados por membro esquerdo e direito. Firth et al. (2005) em seu estudo realizado com equinos PSI de corrida, avaliaram, segundo essa mesma escala, o osso subcondral de metacarpianos direito e esquerdo, e medial e lateral de animais em treinamento ou não. Os autores observaram que a radiodensidade do osso subcondral foi 14% ($p=0.001$) maior no grupo treinado. Em cavalos não treinados, não houve diferença significativa entre lateral e medial do Mc3. Em cavalos treinados, as regiões medial e lateral foram significativamente diferentes apenas no OSC do Mc3 direito (medial maior que lateral; $p<0,05$). Mesmo no subgrupo de alta intensidade de exercício, não houve diferença significativa entre as densidades de medial e lateral no Mc3 esquerdo. As mensurações do lateral foram, em todos os casos, significantemente mais densos que o medial, sendo o mais significativo para os animais treinados ($p=0.001$) do que o grupo não treinado ($p=0.014$) (FIRTH et al., 2005). Machado e colaboradores (2016), apesar de não avaliarem cada côndilo e crista sagital do terceiro metacarpiano, defendem o uso da escala Hounsfield para avaliar densidade óssea e identificação de alterações como esclerose óssea, associando as técnicas de TC e radiografia da articulação MCF (MACHADO et al., 2016).

Ao se avaliar a densidade óssea pela técnica de DOR, as imagens radiográficas obtidas no presente estudo apresentaram sobreposição do bordo dorsoproximal da primeira falange e sabe-se que pode ter interferência quanto à densidade do osso. Contudo, as avaliações foram realizadas da mesma maneira para todas as imagens, e acreditamos que dessa forma foi possível obter um valor médio para que essa técnica tenha aplicabilidade clínica futuramente. No estudo de Whitton e colaboradores (2010), em que se baseou como local de avaliação das densidades do presente trabalho, suas avaliações de metacarpiano foram realizadas em peças anatômicas, somente com a superfície articular, sem interferência de outras estruturas adjacentes (WHITTON et al.,

2010). No estudo radiográfico de Richard e Alexander (2007), eles defendem o uso de várias projeções da articulação MCF para que cada região seja adequadamente avaliada (RICHARD; ALEXANDER, 2007). Ainda nesse estudo, os autores sugerem que apenas pela projeção dorsoproximal-dorsodistal flexionada seria possível a avaliação dos côndilos do metacarpiano principal e da crista sagital. Por nosso trabalho se tratar de peças anatómicas seccionadas proximal à articulação do carpo, para a realização dessa projeção flexionada provavelmente não ficasse no limite fisiológico, talvez até com hiperextensão e por isso não foram realizadas.

Partindo do princípio que tanto o exame radiográfico, quanto a microtomografia avaliam o osso por emissão de raios-x, a diferença entre elas é a qualidade fina de observar detalhes que a micro-TC tem sobre a radiografia. Segundo Bontrager (2003), a radiografia convencional pode mostrar tecidos que tenham uma diferença de pelo menos 10% de densidade, já tanto a TC quanto a micro-TC, podem detectar diferenças de densidade entre tecidos de 1% ou menos. Devido ao fato da micro-TC ser mais sensível do que a radiografia, principalmente com relação à densidade, isto pode explicar a escassez de trabalhos científicos que estudem a DMO por meio de Raios-X (BONTRAGER; LAMPIGNANO, 2015). Porém, no nosso estudo, não houve diferença entre as densidades de DOR e as densidades na micro-TC, foram similares em apenas dois animais (animais 4 e 6).

Quando avaliada a espessura trabecular (Tb.Th), por *software* de micro-TC, dos animais do presente estudo, obteve-se que os valores para o côndilo lateral foi maior para 37,5% dos animais. A respeito do que se tem na literatura (RUBIO-MARTÍNEZ et al., 2008; ZACHARY; MCGAVIN, 2013; MARTIG et al., 2014) sobre espessamento ósseo, que é maior decorrente de lesões, sugere-se que os côndilos laterais são os mais afetados para esse aspecto.

O fato dos animais realizarem os páreos sempre em sentido anti-horário com o membro torácico esquerdo dentro da curva, pode ter lesionado mais os membros esquerdos. Por se tratar de pista de areia, ou seja, piso macio e instável, as alterações em articulação tendem a ser mais frequentes (ONUR et al., 2014). Segundo estudo de Martig e colaboradores (2014), as cargas geradas durante a corrida envolvendo as articulações são determinadas principalmente pela força de reação do solo. A força de reação do solo atua através do centro de pressão do casco e atinge a articulação (MARTIG et al., 2014). Maeda e colaboradores (2012) avaliaram diferentes pisos (grama e areia) em diferentes condições de umidade, e descobriram que os cavalos têm mais dificuldade para correr em

pista escorregadia por excesso de água do que em pista muito úmida. Isso porque o casco não consegue suportar a falta de atrito com a areia úmida e desliza. Assim, observaram que o tempo gasto para percorrer o mesmo percurso era maior em piso macio (MAEDA et al., 2012).

Os dados obtidos pelo Jockey Club foram apenas gerais, sem um acompanhamento profundo do volume, intensidade e frequência de treinamento. Possivelmente esses fatores também influenciem nas características de remodelamento ósseo. Além de tempo de descanso, períodos de treinamento leve por claudicação ou treinos mais fortes perto de competição deveriam ser levados em conta. Para tal, deveria ter sido feito um estudo mais detalhado e prospectivo de equinos atletas, considerando todas essas variáveis. Olive et al. (2017), acreditam que diferenças no regime de treinamento podem alterar a maturação ou cicatrização do osso subcondral e cartilagem sobrejacente. O tipo, a frequência e distribuição de irregularidades em articulação MCF são encontrados em diferentes raças e treinamentos de corrida (OLIVE et al., 2017). Isso corrobora com o estudo de Firth e colaboradores (2004), que acompanhou PSI de corrida, desde o início até 13 semanas de treinamento avaliando a resposta articular (FIRTH et al., 2004). Os autores defendem que a carga de trabalho pode ser facilmente quantificada em cavalos de corrida em condições de treinamento. Além disso, lesões na cartilagem do metacarpo/metatarsofalangeanas estavam presentes em alguns cavalos treinados e não treinados, não estando consistentemente associados com evidência clínica de claudicação, aumento de volume nas articulações ou em tecidos adjacentes. Dados de carga de trabalho em cavalos de corrida provavelmente são altamente relevantes para o estudo dos ossos, tendões e cartilagens durante o treinamento, para o gerenciamento do treinamento e para a análise de risco em populações de cavalos de corrida. Embora lesões da cartilagem produzam pouco efeito clínico, essas lesões já haviam demonstrado serem progressivas e prejudicarem a capacidade atlética (FIRTH et al., 2004).

Era esperado uma variação em DMO entre os animais quanto ao osso subcondral, uma vez que cada um é treinado de forma diferente, com intensidades e ritmos diferentes (NORRDIN; KAWCAK; WAYNE McILWRAITH, 1998). Mas ao comparar animais em treinamento ou não, Ferguson e colaboradores (2008) não observaram diferença entre os dois grupos quando comparado OSC ou cartilagem calcificada, nem a média de espessura ou conteúdo mineral (FERGUSON et al., 2008).

Segundo Carrig (1997), existe uma grande correlação entre idade e o aparecimento de lesões osteoarticulares em pacientes humanos, por causa das alterações bioquímicas

na cartilagem que a torna mais fraca e menos resistente mecanicamente aos estresses de carga (CARRIG, 1997), esse mesmo padrão é reportado em cães (McDEVITT; MUIR, 1976; McCARTHY et al., 2007; YTREHUS, B.; CARLSON, C. S.; EKMAN, 2007). Alterações de cartilagem geralmente ocorrem com diferentes condições mecânicas e sua subsequente degradação na cartilagem articular. No presente estudo a idade não teve interferência nos padrões encontrados, talvez por essas alterações encontradas em seres humanos aparecerem em idade avançada e nossos animais de corrida serem jovens.

Alterações agudas podem ou não incluir danos no OSC, e ao longo da reparação, pode ocorrer reabsorção do mesmo. Da mesma forma, o crescimento excessivo ósseo leva ao adelgaçamento da camada articular e à presença de osso na área da falha na cartilagem (HOEMANN et al., 2011). Algumas alterações encontradas na macroscopia não foram visualizadas na histologia. Isso pode ter ocorrido por não ter sido retirado a região afetada, uma vez que as biopsias foram realizadas do mesmo local e não das lesões, uma vez que o foco do trabalho era adquirir conhecimento sobre o metacarpiano e não avaliando lesões dos atletas. Esse fato concorda com Zachary e McGavin (2013), que observaram que os defeitos superficiais da cartilagem como erosão, que não penetram o osso subcondral, persistem por longos períodos com pouca ou nenhuma alteração histológica. A progressão da lesão, com degeneração da matriz e eventual perda da cartilagem articular restante pode ocorrer ao longo do tempo, particularmente caso exista a presença do osso espessado ou esclerótico subjacente à irregularidade (ZACHARY; MCGAVIN, 2013).

O côndilo lateral é comumente menos lesionado por afecções de OSC que o côndilo medial (TROPE; ANDERSON; WHITTON, 2011; TULL; BRAMLAGE, 2011; PINCHBECK et al., 2013). No nosso estudo não houve diferença significativa entre as regiões avaliadas como um todo.

No estudo de Brama e colaboradores (2000) foi avaliada a quantidade de moléculas específicas como GAG, DNA, água, entre outros na superfície articular do terceiro metacarpiano sem alteração aparente, de equinos com idade de 5 a 9 anos. Os glicosaminoglicanos foram mensurados pela coloração de Azul de dimetilmetileno, e com isso observaram que o membro direito apresentou maiores quantidades médias de GAG 48.4 ± 8.0 ($\mu\text{g}/\text{mg dw}$), quando comparadas com o membro esquerdo 43.8 ± 8.1 ($P < 0.001$). Além disso, o côndilo lateral apresentou maiores quantidades de GAG quando comparado com as outras regiões. O presente estudo encontrou resultados diferentes quando observados por coloração de Azul de Toluidina. O membro esquerdo apresentou valores de densidade óptica maiores, além da crista sagital ser a região mais corada dentre

as três avaliadas. Essa diferença pode ser devido a idade dos animais ser diferente, a concentração de proteoglicanos variar conforme o crescimento e adaptação da articulação.

No estudo de Martig et al. (2018), avaliando PSI de corrida de 2 a 4 anos de idade em treinamento, a idade, duração do treinamento desde o último período de descanso e número de partidas não tiveram influência na micromorfologia do osso subcondral até uma profundidade de 5,1 mm no aspecto palmar do côndilo lateral na área submetida à maior carga (MARTIG et al., 2018). Isso é consistente com um estudo anterior de Muir (2008) em que a idade e a atividade cumulativa de corrida tiveram influência limitada na micromorfologia do osso subcondral em cavalos de corrida puro-sangue (MUIR et al., 2008). No nosso estudo, 54,1% das profundidades das amostras foram acima de 3 mm, porém, somente 6,25% eram maiores que 5 mm. Da mesma forma que Muir (2008) e Whitton (2010), não se observou influência direta da idade dos animais (MUIR et al., 2008; WHITTON et al., 2010).

A histologia óssea subcondral do metacarpiano e a aparência da TC foram semelhantes nos Puro-sangue-ínglês de 18 meses, independentemente de terem sido submetidos a exercícios não controlados a partir das 3 semanas de idade, mas a idade influenciou a densidade mineral óssea volumétrica, novamente independentemente de os cavalos serem submetidos ou não a exercício controlado (DYKGRAAF et al., 2008; KAWCAK et al., 2010). O osso subcondral bem adaptado pode atingir um platô de densidade mineral tecidual que não muda mais em relação à fração do volume ósseo. As microfissuras não mineralizadas observadas em nossos espécimes estavam localizadas paralelamente à superfície articular e não se estendiam para a superfície articular, conforme descrito anteriormente em estudos de micro-TC e microscopia (MUIR et al., 2008; TURLEY et al., 2014; WILLIAMS; SANTACHI, 2017). A relação entre essas alterações ósseas com os danos na cartilagem ainda não é totalmente conhecida (FULLER; FULLER; PEREIRA, 2014).

Todas as articulações normalmente apresentam uma variação na densidade e espessura do osso subcondral através da superfície articular e, conseqüentemente, uma variação nas propriedades mecânicas de cada local (ECKSTEIN et al., 1995).

Análises patológicas do osso subcondral de cavalos de corrida mostraram evidências de que o osso subcondral se torna mais denso em resposta ao exercício (POOL; MEAGHER, 1990). Young et al. (1991a) demonstraram que as propriedades do material

(rigidez) e a porcentagem de área óssea dos terceiros ossos do carpo dos cavalos aumentaram em resposta ao exercício (KAWCAK et al., 2010).

Em um estudo de NORRDIN (1998) e colaboradores, percebeu-se que, geralmente, as lesões mais leves eram encontradas em animais treinados em esteira que as dos cavalos de corrida e foram consideradas um estágio anterior de progressão (NORRDIN; KAWCAK; WAYNE McILWRAITH, 1998). O aumento da quantidade de osso (B.Ar/T.Ar) na região apical palmar refletia o grau de esclerose que havia se desenvolvido. No nosso estudo não se diferenciou a quantidade de osso por regiões dorsal e palmar como nesse estudo, porém, 31,25% dos valores obtidos das amostras foram dentro dos valores observados por eles.

Algumas lâminas de ambas as colorações tiveram que ser refeitas por fragmentação do corte e não impregnação do corante. Pensou-se que o ácido fórmico utilizado para descalcificação atrapalharia a confecção das lâminas de histologia, apesar de ser um ácido mais fraco quando comparado com o EDTA, amplamente utilizado em trabalhos com descalcificação por ser mais curto o tempo necessário. No estudo de Callis e Sterchi (1998), em que foram testados oito agentes descalcificadores, entre eles o EDTA, o ácido fórmico e o ácido nítrico, concluíram que os proteoglicanos podem se perder em certos fixadores e descalcificantes como EDTA, nítrico e clorídrico ácidos (CALLIS; STERCHI; CALLIS, 1998). A partir disso, sugere-se que o ácido fórmico seja um dos mais seguros, desde que em concentração baixa de 4%, utilizado nesse trabalho.

7. CONCLUSÕES

Com o presente estudo foi possível concluir que todos os equinos avaliados, independente de idade, sexo ou volume de competições, apresentaram algum comprometimento de superfície articular de terceiro metacarpiano, contudo, foi possível determinar características morfológicas importantes do tecido osteocondral, como espessura da cartilagem, por exame ultrassonográfico e microtomografia; densidade óssea, por exame radiográfico e microtomografia; trabeculação óssea subcondral, além de características macroscópicas e microscópicas dos côndilos e crista sagital.

Observou-se que os exames ultrassonográficos e radiográficos devem ser usados na rotina clínica como complementares. Além disso, constatou-se correlação direta entre

o exame macroscópico e os exame radiográfico e ultrassonográfico, sendo o ultrassom e a macroscopia os mais sensíveis.

Segundo os parâmetros avaliados nesse projeto, não houve diferença estatística quanto ao local de coleta da amostra no osso metacarpiano, e comparando-se entre os membros, percebeu-se que houve pouca variação entre um membro e outro.

REFERÊNCIAS

- BAGI, C. M.; HANSON, N.; ANDRESEN, C.; PERO, R.; LARIVIERE, R.; TURNER, C. H.; LAIB, A. The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: Correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. **Bone**, v. 38, n. 1, p. 136–144, 2006.
- BASTIANI, G. De; CÔRTE, D. L. F. D.; ERICA, K. B.; KOMMERS, G. .; DENOIX, J.-M. Association of Ultrasound and Anatomopathologic Findings of Equine Metacarpophalangeal Lesions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 10, p. 1218–1225, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2014.08.006>>. Acesso em: 04 nov 2019.
- BATISTE, D. L.; KIRKLEY, A.; LAVERTY, S.; THAIN, L. M. F.; SPOUGE, A. R.; HOLDSWORTH, D. W. Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. 12, p. 986–996, 2004.
- BELOTTA, A. F.; ROCIO, D.; VELASQUEZ, B.; ALEXANDRE, J.; CARNEIRO, M.; BERNARDO, J. D. O. Exames radiográficos das afecções do aparelho locomotor de eqüinos: estudo retrospectivo de 1480 casos (2000 a 2012). **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 4, p. 634–645, 2014.
- BONTRAGER, K. L.; LAMPIGNANO, J. P. Cap 18: Computed Tomography. In: ELSEVIER EDITORA LTDA. (Ed.). **Tratado de técnica radiológica e base anatômica**. 8th Ed. ed. [s.l: s.n.]p. 1961–2027.
- BOURÉ, L. P.; PEARCE, S. G.; KERR, C. L.; LANSDOWNE, J. L.; MARTIN, C. A.; HATHWAY, A. L.; CASWELL, J. L. Evaluation of laparoscopic adhesiolysis for the treatment of experimentally induced adhesions in pony foals. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 2, p. 289–294, 2002.
- BOUXSEIN, M. L.; BOYD, S. K.; CHRISTIANSEN, B. A.; GULDBERG, R. E.; JEPSEN, K. J.; MÜLLER, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.
- BOYDE, A.; FIRTH, E. C. Articular calcified cartilage canals in the third metacarpal bone of 2-year-old thoroughbred racehorses. **Journal of Anatomy**, v. 205, n. 6, p. 491–500, 2004.

BRAMA, P. A.; TEKOPPELE, J. M.; BANK, R. A.; KARSSSENBERG, D.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R. Topographical mapping of biochemical properties of articular cartilage in the equine fetlock joint. **Equine veterinary journal**, v. 32, n. 1, p. 19–26, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10661380>>. Acesso em: 04 nov 2019.

BURR, D. B. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. SUPPL., p. 20–30, 2004.

CALLIS, G.; STERCHI, D.; CALLIS, G. Decalcification of Bone : Literature Review and Practical Study of Various Decalcifying Agents . Methods , and Their Effects on Bone Histology Review Decalcification of Bone : Literature Review and Practical Study of Various Decalcifying Agents . Methods. **Journal of Histotechnology**, v. 21, n. 1, p. 49–58, 1998.

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. 3, p. 641–647, 1995.

CARMONA, J.; PRADES, M. Pathophysiology of osteoarthritis. **Compendium Equine: Continuing Education for Veterinarians**, n. February, p. 28–40, 2009.

CARRIG, C. B. Diagnostic imaging of osteoarthritis. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 27, n. 4, p. 777–814, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(97\)50080-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(97)50080-5)>. Acesso em: 04 nov 2019.

COLLA, L. M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. **Congelamento e descongelamento - sua influência sobre os alimentos**. 2003. Universidade Federal do Rio Grande - RS, 2003.

CRESSWELL, E. N.; MCDONOUGH, S. P.; PALMER, S. E.; HERNANDEZ, C. J.; REESINK, H. L. Can quantitative computed tomography detect bone morphological changes associated with catastrophic proximal sesamoid bone fracture in Thoroughbred racehorses? **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 1, p. 123–130, 2018.

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

DENOIX, J.-M.; AGRÉGE, F. A. Ultrasonographic Examination of Joints in Horses. **AAEP PROCEEDINGS**, v. 47, p. 366–375, 2001.

DIAB, S. S.; STOVER, S. M.; CARVALLO, F.; NYAOKE, A.; MOORE, J.; HILL, A.; ARTHUR, R.; UZAL, F. A. Diagnostic approach to catastrophic musculoskeletal injuries in racehorses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 4, p. 405–413, 2017.

DRUM, M. G.; LES, C. M.; PARK, R. D.; NORRDIN, R. W.; MCILWRAITH, C. W.; KAWCAK, C. E. Correlation of quantitative computed tomographic subchondral bone density and ash density in horses. **Bone**, v. 44, n. 2, p. 316–319, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2008.08.129>>. Acesso em: 04 nov 2019.

DYKGRAAF, S.; FIRTH, E. C.; ROGERS, C. W.; KAWCAK, C. E. Effects of exercise on chondrocyte viability and subchondral bone sclerosis in the distal third metacarpal and metatarsal bones of young horses. **The Veterinary Journal**, v. 178, p. 53–61, 2008.

DYSON, S. J. Radiography and Radiology. In: **Diagnosis and Management of Lameness in the Horse**. Second ed. ed. St. Louis, Missouri 63043: Elsevier Saunders, 2011. p. 168–181.

DYSON, S. J.; MURRAY, R. Osseous trauma in the fetlock region of mature sports horses. **AAEP Proceedings**, v. 52, p. 443–456, 2006.

ECKSTEIN, F.; MÜLLER-GERBL, M.; STEINLECHNER, M.; KIERSE, R.; PUTZ, R. Subchondral bone density in the human elbow assessed by computed tomography osteoabsorptiometry: A reflection of the loading history of the joint surfaces. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 13, n. 2, p. 268–278, 1995.

EDWARDS, G. B. Interpreting radiographs 2: The fetlock joint and pastern. **Equine veterinary journal**, v. 16, n. 1, p. 4–10, 1984.

FERGUSON, V. L.; BUSHBY, A. J.; FIRTH, E. C.; HOWELL, P. G. T.; BOYDE, A. Exercise does not affect stiffness and mineralisation of third metacarpal condylar subarticular calcified tissues in 2 year old thoroughbred racehorses. **European Cells and Materials**, v. 16, p. 40–46, 2008.

FINNILÄ, M. A. J.; THEVENOT, J.; AHO, O. M.; TIITU, V.; RAUTIAINEN, J.; KAUPPINEN, S.; NIEMINEN, M. T.; PRITZKER, K.; VALKEALAHTI, M.; LEHENKARI, P.; SAARAKKALA, S. Association between subchondral bone structure and osteoarthritis histopathological grade. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 35, n. 4, p. 785–792, 2017.

FIRTH, E. C.; ROGERS, C. W.; DOUBE, M.; JOPSON, N. B. Musculoskeletal responses of 2-year-old Thoroughbred horses to early training . 6 . Bone parameters in the third metacarpal and third metatarsal bones Musculoskeletal responses of 2-year-old Thoroughbred horses to early training . 6 . Bone parameters in t. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53, n. 2, p. 101–112, 2005.

FIRTH, E. C.; ROGERS, C. W.; PERKINS, N. R.; ANDERSON, B. H.; GRACE, N. D. Musculoskeletal responses of 2-year-old Thoroughbred horses to early training. 1. Study design, and clinical, nutritional, radiological and histological observations. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 52, n. 5, p. 261–271, 2004.

FULLER, H.; FULLER, R.; PEREIRA, R. M. R. Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução para avaliação de parâmetros morfológicos e funcionais ósseos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 4, p. 352–362, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.07.010>>. Acesso em: 04 nov 2019.

GIELEN, I.; RYSSSEN, B. Van; BREE, H. Van. Computerized tomography compared with radiography in the diagnosis of lateral trochlear ridge talar osteochondritis dissecans in dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, n. 11, p. 77–82, 2005.

- GONZALEZ, L. M.; SCHRAMME, M. C.; ROBERTSON, I. D.; THRALL, D. E.; REDDING, R. W. MRI features of metacarpo(tarso)phalangeal region lameness in 40 horses. **Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association**, v. 51, n. 4, p. 404–14, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20806872>>. Acesso em: 26 jun. 2019.
- HINZ, A.; FISCHER JR, A. T. Comparison of the Accuracy of Radiography and Ultrasonography for Detection of Articular lesions in horses. **Veterinary Surgery**, v. 40, p. 881–885, 2011.
- HIRVINEN, L. J. M.; LITSKY, A. S.; SAMII, V. F.; WEISBRODE, S. E.; BERTONE, A. L. Influence of bone cements on bone-screw interfaces in the third metacarpal and third metatarsal bones of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 8, p. 964–972, 2009.
- HOEMANN, C. D.; SUN, J. M. D.; MCKEE, M. D.; CHEVRIER, A.; ROSSOMACHA, E.; PH, D.; RIVARD, G. E.; HURTIG, M.; BUSCHMANN, M. . Chitosan - glycerol phosphate / blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 1, p. 78–89, 2007.
- HOEMANN, C.; KANDEL, R.; ROBERTS, S.; SARIS, D. B. F.; CREEMERS, L.; MAINIL-VARLET, P.; MÉTHOT, S.; HOLLANDER, A. P.; BUSCHMANN, M. D. International cartilage repair society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. **Cartilage**, v. 2, n. 2, p. 153–172, 2011.
- HURTIG, M. B.; BUSCHMANN, M. D.; KOUAO, A. S. M.; PICARD, G.; CHEVRIER, A. Interspecies comparison of subchondral bone properties important for cartilage repair. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 33, n. 1, p. 63–70, 2014.
- JUNIOR, S. S. R.; MENDES, H. M. F.; BEIER, S. L.; PAZ, C. F. R.; AZEVEDO, D. S. D.; LACERDA, I. G. O.; CORREA, M. G.; FALEIROS, R. R. Avaliações macroscópica e histológica do reparo da cartilagem articular equina tratada com microperfurações do osso subcondral associadas ou não à injeção intraarticular de cartogenina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 272–278, 2016.
- KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W.; NORRDIN, R. W.; PARK, R. D.; JAMES, S. P. The role of subchondral bone in joint disease: a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 2, p. 120–126, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-3306.2001.tb00589.x>>. Acesso em: 04 nov 2019.
- KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W.; NORRDIN, R. W.; PARK, R. D.; STEYN, P. S. Clinical effects of exercise on subchondral bone of carpal and metacarpophalangeal joints in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 10, p. 1252–1258, 2000.
- KNOTT, L.; WHITEHEAD, C. C.; FLEMING, R. H.; BAILEY, A. J. Biochemical changes in the collagenous matrix of osteoporotic avian bone. **The Biochemical Journal**, v. 310, n. 3, p. 1045–51, 1995. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1136000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cn/pmc/articles/PMC1136000/?report=abstract>>. Acesso em: 04 nov 2019.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. Articulação metacarpofalangeana. In: **Anatomia dos Animais Domésticos: vol 1**. [s.l.: s.n.]p. 165–166.

LILEY, H.; DAVIES, H.; FIRTH, E.; BESIÉ, T.; FERNANDEZ, J.; LILEY, H.; DAVIES, H.; FIRTH, E.; BESIÉ, T.; FERNANDEZ, J. Engineering The effect of the sagittal ridge angle on cartilage stress in the equine metacarpo-phalangeal (fetlock) joint. **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering**, v. 5842, p. 0, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10255842.2017.1339795>>. Acesso em: 04 nov 2019.

LOUZADA, M. J. Q. **Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas de peças ósseas. Estudo “in vitro”**. 1994. UNICAMP, 1994.

MACHADO, V. M. V.; AGUIAR, A. C. S.; VIANA, G. F.; CROSIGNANI, N. O.; FILHO, P. Diagnostic value of computed tomography, radiography and ultrasonography in metacarpophalangeal joint disorders in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 66–72, 2016.

MAEDA, Y.; TOMIOKA, M.; HANADA, M.; OIKAWA, M. Influence of Track Surface Condition on Racing Times of Thoroughbred Racehorses in Flat Races. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 11, p. 689–695, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.02.012>>. Acesso em: 04 nov 2019.

MAINIL-VARLET, P.; AIGNER, T.; BRITTEBERG, M.; BULLOUGH, P.; HOLLANDER, A. P.; KANDEL, R.; NEHRER, S.; PRITZKER, K.; ROBERTS, S.; STAUFFER, E. Histological Assessment of Cartilage Repair. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85–A, n. 2, p. 45–57, 2003.

MAJNO, G.; JORIS, I. Pathology of proteoglycans. In: **Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology**. Second Ed ed. New York: Oxford University Press, 2004. p. 282–284.

MARTIG, S.; CHEN, W.; LEE, P. V. S.; WHITTON, R. C. Bone fatigue and its implications for injuries in racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, p. 408–415, 2014.

MARTIG, S.; HITCHENS, P. L.; STEVENSON, M. A.; WHITTON, R. C. Subchondral bone morphology in the metacarpus of racehorses in training changes with distance from the articular surface but not with age. **Journal of Anatomy**, v. 232, n. 6, p. 919–930, 2018.

MCCARTHY, G.; O'DONOVAN, J.; JONES, B.; MCALLISTER, H.; SEED, M.; MOONEY, C. Randomised double-blind, positive-controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 54–61, 2007.

MCDEVITT, C. A.; MUIR, H. Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog. **The Journal of Bone and Joint**

Surgery, v. 58, n. 1, p. 94–101, 1976.

MCDUFFEE, L. A.; STOVER, S. M.; COLEMAN, K. Limb loading activity of adult horses confined to box stalls in an equine hospital barn. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 3, p. 234–237, 2000.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; FULLER, C. J.; HURTIG, M.; CRUZ, A. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the guinea pig. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. SUPPL. 3, p. S93–S105, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2010.05.031>>. Acesso em: 04 nov 2019.

MINAS, T.; GOMOLL, A. H.; ROSENBERGER, R.; ROYCE, R. O.; BRYANT, T. Increased Failure Rate of Autologous Chondrocyte Implantation After Previous Treatment With Marrow Stimulation Techniques. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 5, p. 902–908, 2009.

MORGAN, J. W. How to Take Radiographs of the Metacarpophalangeal/Metatarsophalangeal Joint (Fetlock Joint). **AAEP PROCEEDINGS**, v. 59, p. 359–363, 2013. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2013/Morgan.pdf>>. Acesso em: 04 nov 2019.

MUIR, P.; PETERSON, A. L.; SAMPLE, S. J.; SCOLLAY, M. C.; MARKEL, M. D.; KALSCHUR, V. L. Exercise-induced metacarpophalangeal joint adaptation in the Thoroughbred racehorse. **Journal of Anatomy**, v. 213, p. 706–717, 2008.

MULDER, L.; VAN GRONINGEN, L. B.; POTGIESER, Y. A.; KOOLSTRA, J. H.; VAN EIJDEN, T. M. G. J. Regional differences in architecture and mineralization of developing mandibular bone. **Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 288, n. 9, p. 954–961, 2006.

MURRAY, R. C.; DEBOWES, R. M.; GAUGHAN, E. M.; ATHANASIOU, K. A. Variations in the biomechanical properties of articular cartilage of the midcarpal joint of normal horses. **Veterinary Surgery**, v. 22, p. 393, 1995.

NEVES, F. S. P. **Osteocondrose em cavalos**. 2010. Universidade do Porto, 2010.

NIEMINEN, H. J.; YLITALO, T.; KARHULA, S.; SUURONEN, J. P.; KAUPPINEN, S.; SERIMAA, R.; HAEGGSTROM, E.; PRITZKER, K. P. H.; VALKEALAHTI, M.; LEHENKARI, P.; FINNILÄ, M. A. J.; SAARAKKALA, S. Determining collagen distribution in articular cartilage using contrast-enhanced micro-computed tomography. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, p. 1613–1621, 2015.

NIXON, A. J.; FORTIER, L. A.; GOODRICH, L. R.; DUCHARME, N. G. Arthroscopic reattachment of osteochondritis dissecans lesions using resorbable polydioxanone pins. **Equine veterinary journal**, v. 36, n. 5, p. 376–383, 2004.

NORR DIN, R. W.; KAWCAK, C. E.; WAYNE MCILWRAITH, C. Subchondral bone failure in an equine model of OA.pdf. **Bone**, v. 22, n. 2, p. 133–139, 1998.

O'BRIEN, T. Interpretação radiográfica do boleto. In: **Radiologia de equinos**. [s.l.: s.n.]p. 114–154.

OLIVE, J.; D'ANJOU, M. A.; GIRARD, C.; LAVERTY, S.; THEORET, C. L. Imaging and histological features of central subchondral osteophytes in racehorses with metacarpophalangeal joint osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 9, p. 859–864, 2009.

OLIVE, J.; SERRAUD, N.; VILA, T.; GERMAIN, J. Metacarpophalangeal joint injury patterns on magnetic resonance imaging : A comparison in racing Standardbreds and Thoroughbreds. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 58, n. February, p. 588–597, 2017.

OLSTAD, K.; CNUDE, V.; MASSCHAELE, B.; THOMASSEN, R.; DOLVIK, N. I. Micro-computed tomography of early lesions of osteochondrosis in the tarsus of foals. **Bone**, v. 43, n. 3, p. 574–583, 2008.

OLSTAD, K.; YTREHUS, B.; EKMAN, S.; CARLSON, C. S.; DOLVIK, N. I. Early Lesions of Osteochondrosis in the Distal Tibia of Foals. **Journal of Orthopaedic Research**, n. August, p. 1094–1105, 2007.

ONUR, T. S.; WU, R.; CHU, S.; CHANG, W.; KIM, H. T.; DANG, A. B. C. Joint Instability and Cartilage Compression in a Mouse Model of Posttraumatic Osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 32, n. February, p. 318–323, 2014.

PALMER, J. L.; BERTONE, A. L.; MALEMUD, C. J.; MANSOUR, J. Biochemical and biomechanical alterations in equine articular cartilage following an experimentally-induced synovitis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 4, n. 2, p. 127–137, 1996.

PINCHBECK, G. L.; CLEGG, P. D.; BOYDE, A.; RIGGS, C. M. Pathological and clinical features associated with palmar / plantar osteochondral disease of the metacarpo / metatarsophalangeal joint. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, p. 587–592, 2013.

POOL, R. R. Traumatic injury and osteoarthritis. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. (Ed.). **Joint disease in the horse**. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1996. p. 87–106.

POOL, R. R.; MEAGHER, D. M. Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 6, n. 1, p. 1–30, 1990. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30555-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30555-2)>. Acesso em: 04 nov 2019.

RADIN, E. L.; BURR, D. B.; CATERSON, B.; FYHRIE, D.; BROWN, T. D.; BOYD, R. D. Mechanical Determinants of Osteoarthrosis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 21, n. 3, p. 12–21, 1991.

RASERA, L.; MACORIS, D. G.; CANOLA, J. C.; AITA, A. C.; GOMES, T. L. S. Alterações radiográficas e ultra-sonográficas iniciais em osteoartrite experimental equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 634–640, 2007.

REDDING, W. Use of ultrasonography in the evaluation of joint disease in horses. Part 1: Indications, technique and examination of the soft tissues. **Equine Veterinary Education**, v. 13, p. 198–204, 2001. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3292.2001.tb00090.x/full>>.

REEF, V. B.; WHITTIER, M.; ALLAM, L. G. Joint ultrasonography. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 3, n. 3, p. 256–267, 2005.

REEVES, T. E.; MAH, P.; MCDAVID, W. D. Deriving Hounsfield units using grey levels in cone beam CT : a clinical application. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 41, p. 500–508, 2012.

RICHARD, E.; ALEXANDER, K. Nonconventional radiographic projections in the equine orthopaedic examination. **Equine Veterinary Education**, v. 19, n. 10, p. 551–559, 2007.

ROCHA, B. D. **Estudo cinemático associado ao estudo radiográfico na avaliação da displasia coxofemoral em cães da raça pastor alemão**. 2012. UFMG, 2012.

RUBIO-MARTÍNEZ, L. M.; CRUZ, A. M.; GORDON, K.; HURTIG, M. B. Mechanical proprieties of subchondral bone in the distal aspect of third metacarpal bones from Thoroughbred racehorses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 11, p. 1423–1433, 2008.

SARIN, J. K.; BROMMER, H.; ARGÜELLES, D.; PUHAKKA, P. H.; INKINEN, S. I.; AFARA, I. O.; SAARAKKALA, S.; TÖYRÄS, J. Corrigendum to “Multimodality scoring of chondral injuries in the equine fetlock joint ex vivo” [Osteoarthritis Cartilage 25 (5) (2017 May) 790–798] (S1063458416304666), (10.1016/j.joca.2016.12.007)). **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, n. 8, p. 1377–1378, 2017.

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. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/abstract_S1478061504000271>. Acesso em: 04 nov 2019.

SEIGNOUR, M.; COUDRY, V.; NORRIS, R.; DENOIX, J. M. Ultrasonographic examination of the palmar/plantar aspect of the fetlock in the horse: Technique and normal images. **Equine Veterinary Education**, v. 24, n. 1, p. 19–29, 2012.

SICILIANO, P. D.; KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W. The effect of initiation of exercise training in young horses on vitamin K status. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2353–2358, 2000.

SILVA, M. M. Desenvolvimento de protocolo de avaliação , por determinação de escore , das alterações encontradas nas doenças articulares em equinos e sua correlação com evolução após tratamento São Paulo Desenvolvimento de protocolo de avaliação , por determinação de. **Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, p. 95, 2014.

SMITH, M.; SMITH, R. Diagnostic ultrasound of the limb joints, muscle and bone in horses. **In Practice**, v. 30, n. 3, p. 152–159, 2008.

SOUZA, P. C.; SOUZA, M. V.; ARANZALES, J. R. M.; HADDAD, M. A. Achados radiográficos na região distal dos membros torácicos de equinos sem histórico de

patologia locomotora. **Revista Ceres**, v. 52, n. 302, p. 517–525, 2005.

SPRIET, M.; ESPINOSA-MUR, P.; CISELL, D. D.; PHILLIPS, K. L.; ARINO-ESTRADA, G.; BEYLIN, D.; STEPANOV, P.; KATZMAN, S. A.; GALUPPO, L. D.; GARCIA-NOLEN, T.; MURPHY, B.; STOVER, S. M. 18F-sodium fluoride positron emission tomography of the racing Thoroughbred fetlock: Validation and comparison with other imaging modalities in nine horses. **Equine Veterinary Journal**, p. 1–9, 2018.

STASHAK. T. S. Lameness part II: The Pastern. In: STASHAK. T. S. (Ed.). **Adams' lameness in horses**. Fifth Ed ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002. p. 764–8.

STORY, M. R.; BRAMLAGE, L. R. Arthroscopic debridement of subchondral bone cysts in the distal phalanx of 11 horses (1994-2000). **Equine veterinary journal**, v. 36, n. 4, p. 356–360, 2004.

STOVER, S. M.; MURRAY, A. The California Postmortem Program : Leading the Way. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 24, p. 21–36, 2008.

TROPE, G. D.; ANDERSON, G. A.; WHITTON, R. C. Patterns of scintigraphic uptake in the fetlock joint of Thoroughbred racehorses and the effect of increased radiopharmaceutical uptake in the distal metacarpal / tarsal condyle on performance. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 5, p. 509–515, 2011.

TROPE, G. D.; GHASEM-ZADEH, A.; ANDERSON, G. A.; MACKIE, E. J.; WHITTON, R. C. Can high-resolution peripheral quantitative computed tomography imaging of subchondral and cortical bone predict condylar fracture in Thoroughbred racehorses ? **Equine Veterinary Journal**, v. 47, p. 428–432, 2015.

TULL, T. M.; BRAMLAGE, L. R. Racing prognosis after cumulative stress-induced injury of the distal portion of the metacarpal and third metatarsal bones in Thoroughbred racehorses: 55 cases (2000-2009). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 10, p. 1316–1322, 2011.

TURLEY, S. M.; THAMBYAH, A.; RIGGS, C. M.; FIRTH, E. C.; BROOM, N. D. Microstructural changes in cartilage and bone related to repetitive overloading in an equine athlete model. **Journal of Anatomy**, v. 224, p. 647–658, 2014.

VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R.; YOSHINARI, N. H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica (*) Collagen in osteoarthrotic cartilage. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 3, p. 160–6, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962001000600002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 04 nov 2019.

WEEKES, J. S.; MURRAY, R. C.; DYSON, S. J. Scintigraphic evaluation of metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints in clinically sound horses. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 45, n. 1, p. 85–90, 2004.

WEIGEL, J. P.; ARNOLD, G.; HICKS, D. A.; MILLIS, D. L. Biomechanics of rehabilitation. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 35, n. 6, p. 1255–1285, 2005.

WHITCOMB, M. B. Ultrasonographic evaluation of the metacarpus, metatarsus, and pastern. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 3, n. 3, p. 238–255, 2005.

WHITTON, R. C.; TROPE, G. D.; GHASEM-ZADEH, A.; ANDERSON, G. A.; PARKIN, T. D. H.; MACKIE, E. J.; SEEMAN, E. Third metacarpal condylar fatigue fractures in equine athletes occur within previously modelled subchondral bone. **Bone**, p. 1–6, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2010.07.019>>. Acesso em: 04 nov 2019.

WILLIAMS, J. M.; SANTACHI, E. M. Pathological fracture through a subchondral bone cyst in the proximal phalanx of a horse. **Equine Veterinary Education**, v. 29, n. 6, p. 299–303, 2017.

WILLIAMSON, A. J.; SIMS, N. A.; THOMAS, C. D. L.; LEE, P. V. S.; STEVENSON, M. A.; WHITTON, R. C. Biomechanical testing of the calcified metacarpal articular surface and its association with subchondral bone microstructure in Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v. 50, n. 2, p. 255–260, 2018.

YANG, C.; NIU, C.; BODO, M.; GABRIEL, E.; NOTBOHM, H.; WOLF, E.; MULLER, P. K. Fulvic acid supplementation and selenium deficiency disturb the structural integrity of mouse skeletal tissue. **Biochem J**, v. 289, p. 829–835, 1993.

YTREHUS, B.; CARLSON, C. S.; EKMAN, S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 4, p. 429–448, 2007.

YTREHUS, B.; CARLSON, C. S.; LUNDEHEIM, N.; MATHISEN, L.; REINHOLT, F. P.; TEIGE, J.; EKMAN, S. Vascularisation and osteochondrosis of the epiphyseal growth cartilage of the distal femur in pigs — development with age , growth rate , weight and joint shape. **Bone**, v. 34, p. 454–465, 2004a.

YTREHUS, B.; HAGA, H. A.; MELLUM, C. N.; MATHISEN, L.; CARLSON, C. S.; EKMAN, S.; TEIGE, J.; REINHOLT, F. P. Experimental ischemia of porcine growth cartilage produces lesions of osteochondrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, p. 1201–1209, 2004b.

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. Seção 2: Patologia dos sistemas orgânicos. In: ELSEVIER (Ed.). **Bases da patologia em veterinária**. 5th Editio ed. [s.l: s.n.]p. 935–965.