PEDRO HENRIQUE DE CARVALHO

**Estudo do efeito da injeção de PRP e concentrado de medula óssea
sobre o reparo de defeitos condrais experimentalmente induzidos e
tratados com microfraturas e ácido hialurônico**

São Paulo
2015

PEDRO HENRIQUE DE CARVALHO

Estudo do efeito da injeção de PRP e concentrado de medula óssea sobre o reparo de defeitos condrais experimentalmente induzidos e tratados com microfraturas e ácido hialurônico

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Clínica Cirúrgica Veterinária

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

São Paulo
2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3087
FMVZ

Carvalho, Pedro Henrique de
Estudo do efeito da injeção de PRP e concentrado de medula óssea sobre o reparo
de defeitos condrais experimentalmente induzidos e tratados com microfraturas e ácido
hialurônico / Pedro Henrique de Carvalho. -- 2015.
106 f. :il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

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

1. Defeito condral. 2. Concentrado de medula óssea. 3. Plasma rico em plaquetas.
4. Microfratura. 5. Ácido hialurônico. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da injeção de PRP e concentrado de medula óssea sobre o reparo de defeitos condrais experimentalmente induzidos e tratados com microfraturas e ácido hialurônico.", protocolado sob o nº 2727/2012, utilizando 6 (seis) equídeos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Luis Claudio Lopes Correia da Silva, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/11/2012.

We certify that the Research "Study of the injection of PRP and the bone marrow concentrate relative to the repair of condral defects experimentally induced and treated with microfracture and hialuronic acid", protocol number 2727/2012, utilizing 6 (six) equines, under the responsibility Prof. Dr. Luis Claudio Lopes Correia da Silva, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/28/2012.

São Paulo, 29 de novembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CARVALHO, Pedro Henrique de

Título: Estudo do efeito da injeção de PRP e concentrado de medula óssea sobre o reparo de defeitos condrais experimentalmente induzidos e tratados com microfraturas e ácido hialurônico

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Henrique e Evani,
por possibilitarem a busca de meus
sonhos.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Cláudio Lopes Correia da Silva, pela orientação, apoio, confiança e ensinamentos que se estendem desde a residência;

À Thais Sodré, pelas discussões, imensa ajuda nas análises laboratoriais;

À Juliana (Borbis), pelas imensa ajuda nas análises laboratoriais;

À Prof. Dra. Raquel pelas discussões e apoio laboratorial;

Aos Coordenadores da UNOPAR Werner e Luís Cezar, pelo imenso apoio, compreensão e amizade, sem vocês não teria sido possível a realização do mestrado;

Aos Profs. Bernardo e Daniella Godoi, pela grande amizade e apoio, trocas de aula, vocês me ajudaram muito;

Às mais queridas e competentes anestesistas, Keila e Daniella Godoi, vocês foram incríveis;

À Prof. Flávio Barca, por ter permitido a realização deste estudo no HV – UNOPAR, seu apoio foi extremamente importante;

À Amaury Alfieri, por ter cedido seu laboratório para realização dos processamentos das MSCs e PRP;

À empresa Zoetis, em especial à Pollyana, por ceder Hylartil para realização deste estudo;

Aos Pós-graduandos Kaio, Fernanda e Marilene, pela grande ajuda em diferentes momentos na realização deste projeto, vocês são grandes amigos;

À minha amada Balube (Carolina Bataglin de Carvalho), namorada, amiga, pela imensa ajuda e apoio desde a residência até hoje e por muitos e muitos anos;

À meus estagiários “residentes” UNOPAR: Carlinhos, Maria Eduarda, Marta, Ana Flávia, Marcelinho, Luís, Leandro.

À Prof. Alexey, pelo desenvolvimento da estatística deste estudo;

À todos, que acolham os meus mais sinceros e verdadeiros, agradecimentos;

RESUMO

CARVALHO, P. H. de. **Estudo do efeito da injeção de PRP e concentrado de medula óssea sobre o reparo de defeitos condrais experimentalmente induzidos e tratados com microfraturas e ácido hialurônico.** [Study of the effect of injection of PRP and the bone marrow concentrate relative to the repair of condral defects experimentally induced and treated with microfracture and hialuronic acid]. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Defeitos de cartilagem e a mais comum doença articular, a osteoartrite, são caracterizadas pela destruição da cartilagem articular, e conseqüentemente na perda da função articular em humanos e animais. As estratégias atuais de tratamento, conservativas e cirúrgicas, são insuficientes: não resultam em restauração total da cartilagem hialina, e, portanto trazem um prognóstico reservado a longo prazo. O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos do administração conjunta de concentrado de medula óssea, plasma rico em plaqueta sobre lesões condrais experimentalmente induzidas e tratadas com microfraturas e ácido hialurônico. Foram utilizadas as articulações metacarpofalangeana de 6 éguas, as quais foram divididas em 2 grupos aleatoriamente e cego. Foram feitos defeitos condrais totais através de artroscopia e, todos foram tratados com microfraturas e ácido hialurônico no transoperatório (M 0) sendo, esse repetido após 15 dias (M 15) e 30 dias (M 30). Grupo C (controle) e grupo T (tratado). O grupo T foi tratado com aspirado concentrado de células tronco de medula óssea adicionada ao plasma rico em plaquetas (PRP), os quais foram injetados na articulação no final da cirurgia (M0). O grupo T recebeu ainda 2 aplicações articulares adicionais de PRP em 15 dias (M 15) e 30 dias (M 30). As seguintes avaliações foram realizadas: exame clínico de claudicação, ultrassonografia, estudo radiográfico, avaliações de líquido sinovial (físico, bioquímico e citológico). As avaliações foram realizadas antes da cirurgia (M 0), com 3, 5 e 7 dias. Posteriormente a cada 15 dias (M 15, M 30, M 45 e M 60) e os 3 últimos momentos foram aos 90 (M90), 120 (M120) e 210 (M210) dias. Ao final do experimento os animais foram enviados para abate comercial. Foram verificadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre o grupo tratado e controle para avaliação de proteínas no líquido sinovial corrigido por uréia em 3, 5 e 7 dias; para PGE_2 no líquido sinovial em 3 e 5 dias onde para ambas as variáveis com maiores valores para o grupo tratado. Já a concentração de ácido hialurônico

apresentou maiores valores ($p<0,05$) em 3, 45 e 90 dias no grupo controle. Para as demais variáveis não houve diferença estatística entre o grupo tratado e controle. Porém, notou-se medianas maiores para condroitin sulfato em 3 e 5 dias no grupo controle. Notavelmente, o grupo tratado apresentou melhor escore macroscópico na avaliação do tecido de reparo. Contudo, a administração intra-articular de concentrado de medula óssea e plasma rico em plaquetas sobre lesões condrais induzidas e tratadas com microfraturas e ácido hialurônico produziu uma reação articular transitória, principalmente nos primeiros 60 dias, e foi evidenciado pelo aumento de PGE_2 e proteínas no líquido sinovial, bem como, claudicação, dor a flexão passiva, diminuição da mobilidade articular e aumento de volume articular. No entanto, o tratamento produziu um efeito condroprotetor e anabólico sobre tecido de reparo formado, uma vez que o grupo tratado apresentou menor concentração de ácido hialurônico 3, 45 e 90 dias e melhor escore macroscópico ICRS aos 210 dias.

Palavras-chave: Defeito condral. Concentrado de medula óssea. Plasma rico em plaquetas. Microfratura. Ácido hialurônico.

ABSTRACT

CARVALHO, P. H. de. **Study of the effect of injection of PRP and the bone marrow concentrate relative to the repair of condral defects experimentally induced and treated with microfracture and hialuronic acid.** [Estudo do efeito da injeção de PRP e concentrado de medula óssea sobre o reparo de defeitos condrais experimentalmente induzidos e tratados com microfraturas e ácido hialurônico]. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cartilage defects and the most common joint disease, osteoarthritis, are characterized by destruction of articular cartilage, and consequently in loss of joint function in humans and animals. Current strategies of conservative and surgical treatment are insufficient: they don't result in complete restoration of hyaline cartilage, and bring a poor prognosis on the long term. This study aims to evaluate the effects of co-administration of bone marrow concentrate, platelet rich plasma on experimentally induced chondral lesions and treated with microfractures and hyaluronic acid. The metacarpophalangeal joints of 6 mares were used, which were divided into 2 groups at random and blind. Total chondral defects were made using arthroscopy, and all were treated with microfractures and hyaluronic acid during surgery (M 0) and the hyaluronic acid was repeated after 15 days (M 15) and 30 days (M 30). Group C (control) and T group (treated). Group T was treated with concentrated aspirated bone marrow stem cells added to the platelet rich plasma (PRP), which were injected into the joint at surgery (M0). The T group had another 2 additional joint PRP applications in 15 days (M 15) and 30 days (M 30). The following evaluations were performed: clinical examination of lameness, ultrasound, radiographic studies and synovial fluid analysis (physical, biochemical and cytological). The evaluations were performed before surgery (M 0), 3, 5 and 7 days. Then, every 15 days (M 15, M 30, M 45 and M 60) and the last 3 evaluation were at 90 (M90), 120 (M120) and 210 (M210) days. At the end of the experiment the animals were sent to commercial slaughter. Statistical differences were found ($p < 0.05$) between the treated and control group for evaluation of protein in synovial fluid corrected by urea at 3, 5 and 7 days; for PGE2 in the synovial fluid in 3 to 5 days where both variables had higher values for the treated group. The hyaluronic acid

concentration was higher ($p < 0.05$) at 3, 45 and 90 days in the control group. For the other variables there were no statistical difference between the treated and control groups. However, greater medians were noticed for chondroitin sulfate in 3 to 5 days in the control group. Notably, the treated group showed better macroscopic score in the evaluation of the repair tissue. In conclusion, intra-articular administration of bone marrow concentrate and platelet-rich plasma on induced chondral lesions and treated with microfractures and hyaluronic acid produced a transient response joint, especially during the first 60 days, and it was evidenced by the increase in PGE2 and proteins of the synovial fluid, as well as lameness, pain passive flexion, decreased joint mobility and joint swelling. Besides that, the treatment produced an anabolic chondroprotective effect on repair tissue formed once the treated group showed lower concentration of hyaluronic acid 3, 45 and 90 days, and better ICRS macroscopic scoring at 210 days.

Keywords: Chondral defect. bone marrow concentrate. Platelet-rich plasma. Microfracture. Hyaluronic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do delineamento experimental. G C (Grupo Controle), G T (Grupo Tratamento), Ha (Hialuronato de sódio), PRP (plasma rico em plaquetas), CMO (concentrado de medula óssea), M 0 (tempo transoperatório), M 15 (15 dias), M 30 (30 dias) – São Paulo - 2013-14.	34
Figura 2 - Imagem artroscópica após a criação do defeito cartilagíneo no côndilo metacarpiano medial do membro torácico esquerdo, M 0 – São Paulo - 2013-14	35
Figura 3 - Coleta de medula óssea da 5ª esternébra com auxílio de cânula para biópsia de medula óssea de 11G X 15 cm e seringa de 60 ml – São Paulo - 2013-14.	37
Figura 4 - Imagens mostram as etapas da obtenção do concentrado de medula óssea através do método de gradiente de concentração com Ficoll – São Paulo - 2013-14.	38
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose de GAGs do LS coletado da articulação metacarpofalangeana durante os momentos 3, 5, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 210 dias do grupo controle. CS: CS padrão, 5 µg,; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo – 2013-14	49
Figura 6 - Imagens radiográficas demonstrando, após 210 dias (M210), presença de enteseófito no bordo dorsal proximal da primeira falange (seta) no animal A1 no membro anterior esquerdo ao qual pertencia ao grupo tratamento– São Paulo - 2013-14.....	56
Figura 7 - Imagem ultrassonográfica da articulação metacarpofalangeana do animal A2 nos momentos 0 e 45 dias – São Paulo – 2013-14.....	57
Figura 8 - Imagens artroscópicas obtidas aos 210 dias do animal A2, onde A compõe o grupo tratamento e B o grupo controle – São Paulo – 2013-14.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração e viabilidade em azul de tripan 0,2% de células mononucleares totais obtidas do aspirado de medula óssea após processamento em gradiente de concentração – São Paulo – 2013-14.....	51
Tabela 2 -	Concentração de plaquetas obtidas após método de centrifugação para obtenção de plasma rico em plaquetas de cada animal em todos os momentos – São Paulo – 2013-14	52
Tabela 3 -	Escores de claudicações dos grupos tratamento e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14	52
Tabela 4 -	Escores de dor a flexão passiva dos grupos tratamento e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14	53
Tabela 5 -	Escores de mobilidade articular dos grupos tratamento e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14	53
Tabela 6 -	Escores de volume articular dos grupos tratamento e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14	54
Tabela 7 -	Escores das avaliações radiográficas dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 60 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P– São Paulo – 2013-14.....	54
Tabela 8 -	Escores das avaliações radiográficas dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis Mineralização dos tecidos moles, Aumento da interlinha radiográfica, Diminuição da interlinha radiográfica, Evidência de osteófitos e proliferação	

	óssea, Evidência de enteseófito, Esclerose subcondral e Osteólise subcondral nos dias 0, 60 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P– São Paulo – 2013-14.....	55
Tabela 9 -	Escores das avaliações radiográficas dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis Fragmentos osteocondrais e Tamanho fragmento osteocondral nos dias 0, 60 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P– São Paulo – 2013-14.....	56
Tabela 10 -	Escores das avaliações ultrassonográficas dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo - 2013-14	57
Tabela 11 -	Escores das avaliações ultrassonográficas dos grupos tratado e controle, cada qual separado pelas porções mediais e laterais, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P– São Paulo – 2013-14	59
Tabela 12 -	Escores das avaliações ultrassonográficas das porções medial e lateral dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo	60
Tabela 13 -	Contagem total de células nucleadas dos grupos tratado e controle, com valores das médias $\pm$ desvio padrão e valor de P – São Paulo - 2013-14	62
Tabela 14 -	Escores das avaliações físicas relativas ao líquido sinovial dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 3, 5, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210 com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14	63
Tabela 15 -	Avaliações laboratoriais da concentração de uréia (mg/dL), dos grupos tratado e controle, com valores das médias $\pm$ desvio padrão e valor de P – São Paulo – 2013-14	65
Tabela 16 -	Avaliações laboratoriais da concentração de proteína corrigida por uréia (mg/mg de uréia), dos grupos tratado e controle, com	

	valores das médias $\pm$ desvio padrão e valor de P – São Paulo – 2013-14	65
Tabela 17 -	Avaliações laboratoriais da concentração de PGE ₂ corrigido por uréia (pg/mg de uréia), dos grupos tratado e controle, com valores das médias $\pm$ desvio padrão e valor de P – São Paulo – 2013-14	66
Tabela 18 -	Avaliações laboratoriais da concentração de sulfato de condroitina corrigido por uréia (mg/mg de uréia), dos grupos tratado e controle, com valores das médias $\pm$ desvio padrão e valor de P – São Paulo – 2013-14	68
Tabela 19 -	Avaliações laboratoriais da concentração de ácido hialurônico corrigido por uréia (mg/mg de uréia), dos grupos tratado e controle, com valores das médias $\pm$ desvio padrão e valor de P – São Paulo – 2013-14.	68
Tabela 20 -	Escores ICRS das avaliações macroscópicas do reparo de cartilagem dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis no dia 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ l	Microlitro
AchE	Acetilcolinesterase
AH	Ácido Hialurônico
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CM	Células mesenquimais
cm	Centímetro
CMO	Concentrado de medula óssea
CS	Condroitin sulfato
dL	Decilitro
DP	Desvio Padrão
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>g</i>	Força G
G	Gauge
GAGs	Glicosaminoglicanos
Ha	Hialuronato de sódio
ICRS	International Cartilage Research Society
IGF-1	Fator de crescimento ligado a insulina
IL 1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IU	Unidades Internacionais
IV	Intravenosa
Kg	Quilograma
LS	Líquido sinovial
M	Molar
m ²	Metro quadrado
MAE	Membro Anterior Esquerdo
Mg	miligrama
MHz	Mega Hertz
ml	mililitro
mm	Milímetros

mmol/L	Milimol por litro
MSC	Células tronco mesenquimais
nm	Nanômetro
OA	Osteoartrite
OAS	Oswestry arthroscopy score
OCD	Osteocondrite dissecante
PBS	Solução tampão fosfato
PC	Concentrado de plaquetas
PDA	Tampão 1,3-diaminopropano-acetato
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
pg	Picograma
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRCR	Sobrenadante de coágulo de plaquetas
PRFC	Coágulo de fibrina rico em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RPM	Rotações por minuto
SID	<i>Semel in die</i>
TGF β	Fator de crescimento beta
TNF α	Fator Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	DOENÇA ARTICULAR DEGENERATIVA	22
2.2	TERAPÊUTICA APLICADA À OSTEOARTRITE	23
2.3	TERAPIA CELULAR MESENQUIMAL EM LESÕES ARTICULARES	26
2.4	PLASMA RICO EM PLAQUETAS	28
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVOS GERAIS	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5	MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1	ANIMAIS	32
5.1.1	Critérios para seleção do animais	32
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
5.3	ARTROSCOPIA	34
5.4	ASPIRADO CONCENTRADO DE MEDULA ÓSSEA	36
5.5	PLASMA RICO EM PLAQUETA	38
5.6	PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO	39
5.6.1	Exame Físico	39
5.6.2	Avaliação Radiográfica	40
5.6.3	Avaliação Ultrassonográfica	41
5.6.4	Avaliações do líquido sinovial	43
5.6.4.1	Contagem total de células	43
5.6.4.2	Avaliação Física	43
5.6.4.3	Determinação de Proteína Total	44
5.6.4.4	Avaliação da Viscosidade	44
5.6.4.5	Determinação da Uréia	44
5.6.4.6	Determinação da PGE ₂	45
5.6.4.7	Determinação de TNF α	45
5.6.4.8	Determinação de IL-1 β	46
5.6.4.9	Determinação dos Glicosaminoglicanos	47

5.6.5	Avaliações macroscópicas	49
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6	RESULTADOS	51
6.1	OBTENÇÃO DO ASPIRADO CONCENTRADO DE MEDULA ÓSSEA	51
6.2	OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	51
6.3	EXAME FÍSICO	52
6.4	AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA	54
6.5	AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	56
6.6	AVALIAÇÕES DO LÍQUIDO SINOVIAL	61
6.6.1	Contagem total de células nucleadas	61
6.6.2	Avaliação física	62
6.6.3	Determinação da uréia	64
6.6.4	Determinação da proteína	65
6.6.5	Determinação da PGE₂	66
6.6.6	Determinação do TNFα e IL-1β	67
6.6.7	Determinação de GAGs	67
6.7	AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS	69
7	DISCUSSÃO	71
8	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICES	90

1 INTRODUÇÃO

As articulações são estruturas altamente diferenciadas compostas de tecidos conectivos incluindo osso, cartilagem articular e tecidos moles periarticulares; todos contribuindo para a função articular normal (CARON, 2011). Do ponto de vista das doenças articulares, o componente articular de maior importância é a cartilagem hialina, composta principalmente de colágenos e proteoglicanos em arranjo precisamente organizado. Este tecido é responsável pela função de distribuição de carga da articulação, e, quando normal, a superfície da cartilagem articular desliza uma sobre a outra com mínimo atrito, mesmo quando sob carga extrema (GARVICAN et al., 2010; CARON, 2011). Sabidamente a cartilagem não possui irrigação sanguínea e nem suprimento neural, o metabolismo de condrócitos ocorre principalmente anaerobicamente, obtendo sua nutrição via líquido sinovial através de difusão (TODHUNTER, 1996; EYRE, 2004; GARVICAN et al., 2010; MATSUMOTO et al., 2010).

A osteoartrite é uma doença articular comum e debilitante que afeta todos os mamíferos incluindo cavalos, cães e o homem. Pode ser definida como um processo aberrante de reparo com gradual e progressiva perda da cartilagem articular através de mecanismos de degradação (GARVICAN et al., 2010). Concomitantemente ocorrem alterações bioquímicas, estruturais e biomecânicas dos demais componentes teciduais articulares, levando a perda de função (GARVICAN et al., 2010; CARON, 2011). Em estudo de prevalência realizado por Todhunter e Lust (1992) verificou-se que 54 % dos animais atendidos com claudicação foram diagnosticados com osteoartrite.

Apesar da cartilagem danificada apresentar um limitado potencial intrínseco de reparação, se o ambiente local permitir, células extrínsecas providenciam um mecanismo de reparo. A nova cartilagem produzida, fibrocartilagem, não é comparável a cartilagem hialina do ponto de vista histológico, bioquímico e biomecânico, portanto, não permitem uma função articular normal (BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2008).

Neste sentido diversos procedimentos cirúrgicos têm sido usados para aumentar o reparo cartilagíneo e diminuir a dor, restaurar a função e retardar o desenvolvimento da osteoartrite. As possíveis técnicas utilizadas vão de

debridamento e/ou microfraturas, a métodos incluindo implantação de moldes de polímeros, com e sem células, tem sido desenvolvidas e usadas para reparo cartilágneo (MCNICKLE et al., 2008).

Seguindo princípios de mínima invisibilidade e exequibilidade, o presente projeto visa avaliar os efeitos da administração conjunta de plasma rico em plaquetas e aspirado concentrado de medula óssea sobre o reparo de lesões condrais experimentalmente induzidas e tratadas com microfraturas e ácido hialurônico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A função normal das articulações sinoviais depende da integridade da anatomia normal e funcionamento apropriado de cada componente celular. São componentes de uma articulação sinovial: osso, cartilagem articular, líquido sinovial, membrana sinovial, cápsula fibrosa articular e estruturas ligamentosas. Em ambos os lados da articulação sinovial o osso subcondral é coberto por cartilagem articular, a qual providencia íntima superfície de contato com mínima fricção (FRISBIE, 2011).

As três principais funções da membrana sinovial são fagocitose, regulação da concentração de proteína e hialuronato de sódio do líquido sinovial, e regeneração (MCILWRAITH, 2011).

A cartilagem articular tem a aparência de leite, opaca em regiões espessas e translúcida em regiões mais finas. A superfície não é lisa. Estudos com microscopia eletrônica mostram ondulações e depressões irregulares. A cartilagem articular de um equino é geralmente do tipo hialina, porém, fibrocartilagem também está presente nas junções com a membrana sinovial, periósteo (chamada de zona de transição) e no menisco. Histologicamente, a cartilagem articular de um adulto tem sido dividida em 4 camadas, onde os condrócitos têm diferentes aparências dentre estes planos (MCILWRAITH, 2011).

O peso seco da cartilagem articular é composto predominantemente de colágeno (EYRE, 2004) e o restante de proteoglicano e glicoproteína (TODHUNTER, 1996). Visto que a cartilagem de adultos não contém suprimento vascular e neural, os condrócitos executam metabolismo anaeróbico, obtendo sua nutrição via líquido sinovial através de difusão. Observa-se que o colágeno tipo 2 é específico da cartilagem hialina e está em abundância neste tecido, compreendendo 90 a 95 %, portanto os maiores biomarcadores do turnover de cartilagem são epítopes derivados do colágeno tipo 2 (GARVICAN, 2010).

Os proteoglicanos compõem a maior parte da parte sólida da matriz cartilaginosa da articulação. Eles ocupam o espaço entre as fibrilas de colágeno. A molécula básica do proteoglicano é formada por uma proteína central e cadeia lateral de glicosaminoglicano, principalmente sulfato de condroitina e queratam sulfato. A ligação entre o proteoglicano e o hialuronan forma o agregan. Essa ligação ocorre através de uma ligação não covalente entre a proteína central do

proteoglicano e o hialuronan estabilizados por uma outra proteína ligante (MCILWRAITH, 2011). Outros proteoglicanos encontrados em menor quantidade incluem o decorin, biglican, lumican e fibromodulina, os quais são molecularmente semelhantes e interagem com vários constituintes da matriz como colágenos. Acredita-se que estes proteoglicanos menores podem regular diversos processos metabólicos dentro da cartilagem (CARON, 2011).

2.1 DOENÇA ARTICULAR DEGENERATIVA

A osteoartrite (OA) tem sido definida como uma doença de articulações diartrodiais, caracterizada por degeneração e perda da cartilagem articular e proliferação óssea sobre a superfície e margem articular (CARON, 2011). Em humanos e equinos a osteoartrite não é, provavelmente, uma doença isolada, mais reflete uma resposta comum dos componentes teciduais articulares a um número de causas potenciais (BAXTER, 2011; CARON, 2011). A artrite traumática inclui uma diversidade de estados patológicos e clínicos que se desenvolvem depois de episódios traumáticos únicos ou repetitivos. Podem incluir sinovites (inflamação da membrana sinovial), capsulites (inflamação da cápsula articular), entorses (com lesões nos ligamentos colaterais associados a articulação), ou fraturas intra-articulares e rupturas de menisco (MCILWRAITH et al., 2001; BAXTER, 2011).

A sinovite é importante em cavalos por produzir dor, microinstabilidade e mediadores inflamatórios. Os mediadores inflamatórios atualmente mais relevantes incluem citocinas, TNF alfa e IL-1, metaloproteinases, agrecanases, prostaglandinas e radicais livres (McILWRAITH, 2005b).

Considera-se as metaloproteinases como família de enzimas de maior importância na degradação de cartilagem. São secretadas na forma de proenzimas latentes e ativadas extracelularmente por proteinases serina. Aumento da expressão destas enzimas na membrana sinovial e na cartilagem articular tem sido demonstradas, particularmente pela IL-1 (TRUMBLE et al., 2001). Notavelmente, a IL-1 também aumenta a secreção de agrecanase e prostaglandina E₂ (FRISBIE et al., 2002).

O trauma direto sobre a cartilagem articular pode causar defeito físico imediato ou iniciar um processo degradativo. Isso ocorre nesta situação há liberação de IL-1, a qual estimula os condrócitos lesados a produzir metaloproteinases e PGE₂. Por outro lado, a cartilagem comprometida pela perda de GAGs ou colágenos fica vulnerável às forças mecânicas normais (McILWRAITH, 2005b).

Em adição aos danos mediados pela sinovite e trauma direto sobre a cartilagem, o osso subcondral também desempenha uma via de desenvolvimento da doença articular degenerativa (McILWRAITH, 2005b, 2011a).

A osteoartrite é uma doença multifatorial que pode resultar de uma complexa interação entre forças mecânicas, celular e bioquímica (HUNTER, 2011).

O conhecimento sobre os fatores predisponentes e o entendimento que a natureza dinâmica da osteoartrite gerando degeneração da cartilagem são importantes para prevenir e diagnosticar a doença nos estágios iniciais (BROMMER et al., 2005). A demanda atlética imposta aos cavalos de alto desempenho pode resultar na sobrecarga da cartilagem, especialmente na articulação metacarpofalangeana, cuja qual a degeneração da cartilagem articular tem sido frequentemente encontrada (POOL, 1996; BROMMER et al., 2005). Segundo Bertone (2004) a afecção apresenta um início insidioso, comumente bilateral com um membro mais afetado que o outro. O diagnóstico se baseia no exame físico (andar rígido, encurtado, com claudicação assimétrica que piora com o exercício) e exame radiográfico, tendo como achados comuns osteófitos, esclerose do osso subcondral e colapso do espaço articular. A extensão da degradação articular pode somente ser acessada por visualização direta através da artroscopia, porém, exames diagnósticos avançados, como a ressonância magnética, podem ser utilizados. A OA de boleto apresenta prognóstico ruim para esporte (BERTONE, 2004).

2.2 TERAPÊUTICA APLICADA À OSTEOARTRITE

Pesquisas indicam que aproximadamente 60 % das claudicações estão relacionadas à osteoartrite (McILWRAITH, 2011a).

O ponto chave do tratamento clínico é o manejo da sinovite aguda, com ou sem capsulite, para tornar a articulação normal o quanto antes. A supressão da sinovite e capsulite é importante para prevenir a formação de produtos derivados da inflamação que irão causar alterações na cartilagem articular e OA. Outro ponto crítico de controle é o alívio da dor e minimização da microinstabilidade articular gerada pelo excesso de líquido sinovial (MCILWRAITH, 2011a; FRISBIE, 2012). No tratamento da osteoartrite diversas drogas podem ser utilizadas como fármacos com ação analgésica (drogas modificadoras dos sintomas da osteoartrite). Drogas modificadoras da doença OA, terão mecanismo de ação influenciando positivamente o ambiente sinovial e a cartilagem articular. Essas eram chamadas de drogas condroprotetoras (MCILWRAITH, 2001).

Diversos tratamentos têm sido descritos para osteoartrite e seus potenciais causadores (MCILWRAITH, 2001). Dentre os tratamentos comumente utilizados estão o uso sistêmico ou local de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e esteroidais (AIEs), substâncias precursoras dos proteoglicanos e condroprotetoras, a administração intra-articular de associações de potentes AIEs ao ácido hialurônico e ao sulfato de condroitina, se baseando na supressão sintomática da inflamação (YAMADA et al., 2012). Essas terapias são paliativas, e não representam benefícios biológicos importantes (MCILWRAITH, 2005a), podem ser úteis na melhora da viscosidade do líquido sinovial, redução da inflamação, consequente proteção do colágeno e da matriz extracelular, porém, ainda não conferem qualidade de reparação condral satisfatória, não resultando na regeneração da cartilagem, permitindo a progressão da doença (GOODRICH; NIXON, 2006; MCILWRAITH, 2005b).

A cartilagem articular raramente regenera a cartilagem hialina depois da lesão. As mais simples lesões lacerativas de cartilagem chegam a uma fase onde não ocorre a cicatrização completa, a qual permanece inalterada (HUNZIKER et al., 1996). Lesões profundas de cartilagem, que violam a linha de marcação “tide-mark” e se estendem até o osso subcondral, resultam em uma melhor cicatrização. Isto é devido à proliferação das células mesenquimais indiferenciadas dos tecidos mais profundos. Em cavalos, a progressão dos defeitos de cartilagem de tecido de granulação a tecido fibroso, e, finalmente fibrocartilagem é mais lento que em roedores e cães. O tecido fibroso sofre progressiva condrificação e forma uma massa fibrocartilaginosa e perde a ligação com a borda cartilaginosa original.

Portanto, a profundidade da lesão, o tamanho, localização em relação a carga de apoio e a idade do animal influenciam a taxa de reparo e a resiliência da nova superfície de cartilagem formada (NIXON, 2002).

Diversas técnicas cirúrgicas têm sido utilizadas para melhorar e acelerar o reparo de cartilagem. Avanços da artroscopia em equinos tem seguido o uso da técnica minimamente invasiva para, seguramente, avaliar e tratar lesões articulares em várias localizações em equinos. Geralmente a cicatrização de defeitos condrais e osteocondrais é melhor em animais mais jovens devido a elevada capacidade mitótica dos condrócitos, maior síntese de matriz e íntimo contato de suprimento vascular do complexo articular-epifiseal. Esforços com a finalidade de reparar lesões focais têm obtido resultados inconsistentes, e muitos estudos clínicos e experimentais tem sugerido que o tecido de reparo obtido é fibrose ou fibrocartilagem, que tendem a degenerar dentro do primeiro e segundo anos de pós-operatório. Métodos que podem aumentar a quantidade e características hialinas do tecido de reparo cartilágneo, deverão melhorar os resultados em longo prazo. Os seguintes critérios devem ser considerados na utilização e desenvolvimentos destas técnicas: Ser aplicável através de artroscopia; resultante de técnicas de manipulação local ou usar transplantes simples de tecido; possível de ser utilizada por cirurgião especialista com mínima demora entre o diagnóstico e decisão para cirurgia; econômico; testada em protocolos de pesquisa e oferecer vantagens com relação à durabilidade, bem como qualidade da cartilagem hialina no tecido de reparo e ser possível de utilizar em diversos locais de lesões agudas, subagudas e as vezes crônicas (NIXON, 2002). Segundo Hunziker et al. (2015), o reparo de lesões cartilágneas em articulações sinoviais continua sendo um grave problema clínico sem resolução, apesar da atividade científica nesta área ter sido realizada fortemente, não tem sido obtido grande progresso na última década.

Dentre as técnicas de manipulação local para reparo de lesões cartilaginosas em equinos é utilizado o debridamento de cartilagem, fixação da cartilagem, condroplastia usando lâminas motorizadas para remover fibrilações de cartilagem (SHAVER), técnica de espongialização ou perfuração do osso subcondral usando brocas, artroplastia utilizando lâmina abrasiva, microfraturas uniformes do osso subcondral (NIXON, 2002; MCILWRAITH, 2005a). A técnica de microfraturas possui limites no que tange tamanho da lesão a ser tratada e melhora funcional a longo prazo (ENEA et al., 2015). Outras técnicas como a mosaicoplastia e mais

recentemente, em humanos, tem sido utilizada a técnica de implante autólogo de condrócito e procedimentos relacionados, no entanto esta técnica tem um alto custo e necessidade de operar o paciente duas vezes (KESSLER et al., 2008; ENEA et al., 2015).

2.3 TERAPIA CELULAR MESENQUIMAL EM LESÕES ARTICULARES

A terapia celular para tratar doença articular em equinos tem sido relatada a mais de 30 anos, orientadas pelo significativo impacto das doenças articulares sobre a performance de cavalos, capacidade reparativa inadequada da cartilagem articular e limitação de opções de tratamento clínico e cirúrgico sobre a artrite instalada (FRISBIE; STEWART, 2011).

As células mesenquimais (CM) são derivadas de tecidos mesenquimais adultos e tem a habilidade de se diferenciar em osso, cartilagem e gordura. As fontes de CM mais comumente utilizadas clinicamente são: medula óssea (FORTIER et al., 1998; VIOLINI et al., 2009), tecido adiposo (VIDAL et al., 2007; DEL BUE et al., 2008) e sangue do cordão umbilical (MOSNA et al., 2010). Desde que foi descoberta grande tem sido o interesse biomédico da comunidade científica, pois as CM podem ser isoladas e expandidas diferenciando-se em diversos tipos de tecidos musculoesqueléticos. Soma-se a estes aspectos a notável atividade imunomoduladora e anti-inflamatória (STEWART; STEWART, 2011).

O critério original utilizado para identificar as células mesenquimais envolve a habilidade de aderência a substrato plástico, capacidade de expansão clonal e a capacidade de se diferenciar em diversas linhagens mesenquimais (PITTENGER et al., 1999).

Atualmente, não existe técnica clínica satisfatória para reparo de defeitos de cartilagem articular. No entanto, o que se tem usado são técnicas envolvendo a estimulação da medula óssea, a qual o osso subcondral disponibiliza células mesenquimais e citocinas para reparo da cartilagem. Entretanto, estes procedimentos propiciam o preenchimento do defeito com fibrocartilagem, a qual possui propriedades biomecânicas e bioquímicas diferentes da cartilagem normal hialina, e sofre degeneração mais facilmente (HUNZIKER, 2002).

Diversos estudos recentes têm desenvolvido técnicas de reparo para lesões focais sobre a cartilagem. Técnicas que envolvem enxertos osteocondrais, artroplastia em mosaico com enxerto osteocondral, tem sido utilizados em casos de lesões císticas focais, porém diversas limitações têm sido citadas (DESJARDINS et al., 1991; PEARCE et al., 2003). Outra abordagem para tratamento de lesão cartilaginosa focal utiliza estratégia baseada em condrócitos, ou seja, implantação de condrócitos expandidos ex-vivo, com resultado favorável para melhora dos sintomas clínicos, porém, os maiores problemas encontrados foram a necessidade de 2 procedimentos, morbidade do sítio doador e instabilidade fenotípica do condrócito (HARRIS et al., 2010).

No primeiro relato, o aspirado de medula óssea foi coletada da crista ilíaca de 3 pacientes, 3 semanas antes do procedimento de reparo cartilaginoso e foi expandido em cultivo de 1 camada usando soro autólogo. Posteriormente essas células mesenquimais foram suspendidas em solução de colágeno e implantadas sobre o defeito articular e coberto por flap sinovial ou periosteal. Todos os pacientes mostraram moderada melhora sustentada por 17 a 27 meses depois da implantação. Um dos pacientes foi submetido a biópsia onde foi verificada presença de fibrocartilagem (WAKITANI et al., 2002)

Atualmente, os relatos sobre o reparo da cartilagem articular usando células mesenquimais ainda é limitado. Fortier et al. (2010) realizaram estudo para comparar os resultados do tratamento com aspirado concentrado de medula óssea com os resultados de microfraturas sobre o reparo de defeitos totais de cartilagem em modelo equino e verificaram que o grupo tratado com o aspirado concentrado de medula óssea apresentou cicatrização superior ao grupo tratado apenas com microfratura, porém, não houve formação de cartilagem hialina. Yamada et al. (2012) realizaram estudo avaliando o efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas e células tronco mesenquimais de gordura sobre o reparo de lesões condrais articulares induzidas em equinos e verificaram que o grupo tratado com a associação PRP (plasma rico em plaquetas) e CM de gordura apresentou um melhor aspecto macroscópico, histopatológico e histoquímico do tecido de reparação em relação ao grupo controle.

2.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Nos últimos 15 anos, o plasma rico em plaquetas (PRP) tem atraído a atenção como procedimento inovador e promissor para estimular o reparo da cartilagem danificada devido a grande concentração de fatores de crescimento estocados nos grânulos alfa das plaquetas, a qual tem parte importante na promoção do anabolismo cartilaginoso (ULRICH-VINTHER et al., 2003). Dentre os diversos fatores de crescimento presentes no grânulo alfa das plaquetas, o fator de crescimento beta (TGF β) se destaca com um importante papel sobre a expressão fenotípica, diferenciação condrogênica, deposição de matriz e supressão dos efeitos inflamatórios causados pela interleucina 1 (IL 1) sobre síntese de proteoglicano da cartilagem (FRAZER et al., 1994; PUJOL et al., 2008). O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) estimula o fenótipo hialino, a proliferação dos condrócitos e a síntese de proteoglicanos (SCHMIDT et al., 2006). O fator de crescimento da insulina estimula a produção de proteoglicano, e muitas outras moléculas bioativas estão envolvidas na regeneração da cartilagem, metabolicamente independente ou através de interação sinérgica (O'KEEFE et al., 1994).

O PRP é composto de plaquetas, fatores de crescimento, hemácias, leucócitos e proteínas plasmáticas, porém, como o processo de obtenção deste ocorre através de diferentes protocolos de centrifugação, possui uma baixa concentração de hemácias e leucócitos. Diversos produtos têm sido obtidos das plaquetas como o plasma rico em plaquetas (PRP), coágulo de fibrina rico em plaquetas (PRFC), sobrenadante de coágulo de plaquetas (PRCR) e concentrado de plaquetas (PC) (TEXTOR, 2011).

O PRP é obtido através de uma série de centrifugações. Yamada et al. (2012) realizaram preparação do PRP com obtenção de 80 ml de sangue, através de venopunção da jugular, acondicionou em frascos com citrato de sódio a 3,8 %. O sangue total foi centrifugado pela primeira vez a 300 g por 10 minutos, promovendo a separação das células vermelhas. Do plasma sobrenadante foi descartado os 50 % superiores (plasma pobre em plaquetas – PPP) e a zona de névoa (“buffy coat”). Os 50 % restantes foram submetidos à nova centrifugação à 660g por 10 minutos. Novamente, os 50 % superiores foram descartados, os 50% restantes foram

agitados formando o PRP. O PRP deve possuir uma contagem igual ou maior que 300.000 plaquetas/ μ l. Outro método de obtenção de PRP utiliza metodologia diferenciada e prática, a qual utiliza filtração por gravidade (E-PET, Pall Animal health, Port Washington, NY, USA) (TEXTOR, 2011).

Apesar de muitos clínicos acreditarem que as plaquetas são ativadas por meio rico em colágeno, as quais são expostas após a administração, um recente estudo mostrou que apenas uma parcial degranulação ocorre. Diversos agentes e metodologias têm sido aplicados na ativação de plaquetas como trombina bovina, quitosana, cloreto de cálcio e congelamento (DUNKEL et al., 2012).

Mais recentemente o PRP foi popularizado para o uso em humanos e equinos de esporte, particularmente para tratamento de lesões de ligamentos e tendões (TEXTOR, 2011). Diversos artigos têm demonstrado o potencial do uso do PRP sobre as lesões musculoesqueléticas. Abellanet e Prades (2009) realizaram avaliação da utilização de PRP em 42 cavalos com osteoartrite e verificaram que o uso é seguro, efetivo e simples para aliviar a dor articular evidenciados pelo exame de claudicação e variáveis clínicas. O mesmo autor verificou diferença estatística após a primeira aplicação de PRP, porém, isso não ocorreu entre a segunda e terceira doses. Em outro estudo Kong et al. (2011) compararam a eficácia do tratamento com injeção do PRP com a viscosuplementação (ácido hialurônico) para tratamento de joelhos com lesões articulares degenerativas e osteoartrites e verificou que o PRP apresentou maior e mais longa eficácia que o ácido hialurônico na redução da dor, recuperando a função articular. Os melhores resultados foram obtidos em jovens com menor grau de degeneração articular. Milano et al. (2012) verificaram os efeitos histológicos e biomecânicos do tecido de reparo obtidos após o tratamento com microfraturas com e sem aplicações repetidas de PRP em lesões condrais totais focais do joelho em ovelhas e verificaram que cinco aplicações de PRP com microfraturas apresentaram melhor e mais durável efeito que o grupo tratado apenas com microfraturas, porém, nenhum dos tratamentos produziu cartilagem hialina.

3 JUSTIFICATIVA

Pesquisas recentes demonstram que a utilização do plasma rico em plaquetas e células tronco mesenquimais de medula óssea apresentam efeitos benéficos na qualidade do tecido de reparo no que tange a deposição de matriz extracelular, integração deste com o tecido adjacente normal e melhoria clínica dos animais com osteoartrite, porém, em nenhum dos estudos evidenciou-se formação de cartilagem hialina. Até o momento não foram publicados estudos com a utilização seriada de plasma rico em plaquetas associada à administração de aspirado concentrado de medula óssea sobre o reparo de lesões condrais tratadas com microfraturas e viscosuplementação com ácido hialurônico.

Acreditamos que a somatória dos efeitos benéficos de ambos os tratamentos possam levar ao sinergismo e melhoria na qualidade do tecido cartilágneo de reparação, seguindo os princípios da engenharia tecidual.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da administração de concentrado de medula óssea com adição de plasma rico em plaquetas como método de reparo de defeitos condrais totais experimentalmente induzidos e convencionalmente tratados com microfraturas e ácido hialurônico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar clinicamente os animais após a indução da lesão condral, e após a realização dos tratamentos.
- Avaliar as características físicas, químicas e citológicas do líquido sinovial antes e após a indução da lesão articular em resposta aos tratamentos realizados.
- Avaliar a resposta inflamatória articular através dos biomarcadores: PGE_2 , $\text{TNF } \alpha$, $\text{IL } 1\beta$ e GAGs.
- Avaliar o tecido de reparo formado através do escore macroscópico ICRS.

5 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir será descrita detalhadamente a metodologia experimental empregada neste estudo.

O presente método de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº 2727/2012.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 6 equinos adultos hígidos, sem raça definida, todas fêmeas, idade (3 a 5 anos) e peso vivo (300 - 400 kg) variados, alojados no Hospital Veterinário da Universidade Norte do Paraná localizado em Arapongas, Paraná durante todo o período experimental.

Durante o estudo os animais foram mantidos em baias individuais de 9 m² (3 x 3 metros) sob condições naturais de luz, temperatura e umidade, com água *ad libitum*, alimentação a base de feno de gramínea *coast –cross* (*Cynodum dactylum*) e ração comercial de manutenção.

5.1.1 Critérios para Seleção dos Animais

Os animais foram selecionados e adquiridos de haras da região norte do Paraná. Os animais utilizados eram éguas receptoras de embrião com perda da função reprodutiva e, portanto seriam enviadas para abate.

Para escolha dos animais foi inicialmente efetuada avaliação do estado geral, com realização de exame físico (frequência cardíaca e respiratória, temperatura retal, coloração de mucosas e tempo de preenchimento capilar) e exames laboratoriais (hemograma, proteína total e fibrinogênio plasmático), sendo descartados aqueles que apresentassem variações patológicas destes parâmetros.

Após essa avaliação, os equinos selecionados foram submetidos a um exame mais acurado da articulação metacarpofalangeana de ambos os membros torácicos por inspeção e palpação, excluindo-se os animais que apresentavam edema, efusão, dor ou aumento de temperatura na região. A seguir os animais foram avaliados quanto à presença de claudicação ao passo e ao trote, em linha reta e no círculo, bem como resposta ao teste de flexão dessas articulações, excluindo-se os animais que apresentavam claudicação e teste de flexão positivo. Logo após, foi realizado estudo radiográfico das articulações metacarpofalangeanas dos membros torácicos visando excluir aqueles animais que apresentassem qualquer alteração no padrão de imagem obtido.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 6 equinos adultos, livres de alterações musculoesqueléticas, durante 7 meses. Os animais foram submetidos à artroscopia da articulação metacarpofalangeana de ambos os membros torácicos para criação de defeito condral de 0,9 cm de diâmetro no côndilo medial dorsal do osso terceiro metacarpiano. Todas as articulações em experimento foram tratadas com microfraturas e hialuronato de sódio (Hilartyl vet® – Pfizer), cujo qual será administrado através de artrocentese no transoperatório (M 0), com quinze (M 15) e 30 (M 30) dias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais. O grupo controle (C) recebeu 20 mg de hialuronato de sódio e 2 ml de solução de cloreto de sódio 0,9 % em três momentos iniciando no transoperatório (M 0) e o restante a cada 2 semanas (M 15 e M 30). O grupo tratamento (T) recebeu 20 mg de hialuronato de sódio em M 0, 15, 30; plasma rico em plaquetas (PRP) em M 0, 15 e 30 e aspirado concentrado de medula óssea autólogo em M 0 (Figura 1).

As avaliações foram realizadas imediatamente antes da cirurgia (M 0) e com 3 (M 3), 5 (M 5), 7 (M 7), 15 (M 15), 30 (M 30), 45 (M 45), 60 (M 60), 90 (M 90), 120 (M 120), 210 (M 210) dias após a cirurgia, onde ao final do experimento, ou seja, com 210 dias os animais foram enviados para abate, no King Meat alimentos S/A, frigorífico de equinos, localizado em Apucarana no estado do Paraná.

Figura 1 - Esquema do delineamento experimental. G C (Grupo Controle), G T (Grupo Tratamento), Ha (Hialuronato de sódio), PRP (plasma rico em plaquetas), CMO (concentrado de medula óssea), M 0 (tempo transoperatório), M 15 (15 dias), M 30 (30 dias) – São Paulo - 2013-14

Fonte: (CARVALHO, 2013-14).

5.3. ARTROSCOPIA

Para os procedimentos a seguir descritos foram utilizados: óptica artroscópica de 4 mm de diâmetro, lente de 30° com 18 cm de comprimento, marca Tholzer endoscopy; camisa artroscópica com válvula e obturador rombo marca Tholzer endoscopy; cabo de luz de 2,00 metros marca Tholzer endoscopy; videocâmera modelo pluscam-10H, marca Tholzer endoscopy; fonte de luz modelo LX-250, marca Tholzer endoscopy.

Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas. No pré-operatório os boletos dos membros anteriores foram tricotomizados da coroa do casco até a base do carpo, lavados com água e sabão. Após pré-operatório padrão os animais foram sedados com cloridrato de xilazina 10 % (0,7 mg/kg de peso vivo por via intravenosa - IV), induzidos com cloridrato de cetamina (2,2 mg/kg de peso vivo IV) associada a diazepam (0,05 mg/kg de peso vivo IV). Logo após os animais foram entubados com sonda orotraqueal, levados para mesa de cirurgia onde foram

mantidos em plano anestésico através de anestesia inalatória com isofluorano vaporizado em oxigênio a 100% e ventilação controlada. Foram posicionados em decúbito dorsal com ambas as articulações metacarpofalangeanas estendidas.

Foi realizada antissepsia com clorexidine degermante e clorexidine alcoólico. Logo após, o campo operatório foi montado de forma a possibilitar a realização da artroscopia metacarpofalangeana dorsal bilateral. Inicialmente a articulação foi puncionada com agulha 40 x 10mm, coletado líquido sinovial e se seguiu a distensão articular com 35 ml de solução de ringer com lactato. A seguir, foi criado o portal artroscópico no recesso dorsal, proximal e lateral com auxílio de lâmina de bisturi nº 11. O portal de instrumental foi feito dorsal, medial e proximal de forma a permitir a triangulação dos portais para criação do defeito condral.

Foi feita lesão de cartilagem de diâmetro igual a 0,9 cm no côndilo medial do osso terceiro metacarpiano com auxílio de uma cureta de bruns 00 (Figura 2 A). A lesão se estendeu por todos os planos cartilagíneos. Foram feitas 5 microfraturas no leito de todos os defeitos criados, iniciando das bordas e em direção ao centro da lesão (Figura 2 B).

Figura 2 - Imagem artroscópica após a criação do defeito cartilágneo no côndilo metacarpiano medial do membro torácico esquerdo, M 0 – São Paulo - 2013-14

Fonte: (CARVALHO, 2013-14).

Legenda: Na imagem A nota-se a criação do defeito condral de 0,9 cm, o qual foi medido com o probe milimetrado. Na imagem B nota-se as 5 microfraturas que foram criados com a aste de microfratura.

Os fragmentos oriundos das microfraturas foram recolhidos por pinça artroscópica. A cânula de irrigação e aspiração foi introduzida na articulação para lavagem articular e remoção dos debris oriundos do desgaste da cartilagem articular. Ao final do procedimento artroscópico foi feita a administração dos tratamentos em estudo do Grupo C e T aleatoriamente. A pele foi suturada com nylon 2-0 em padrão

simples interrompido. A seguir foi confeccionada bandagem estéril compressiva com malha tubular, algodão e atadura elástica adesiva desde a coroa do casco até a base do carpo de ambos os membros anteriores. Esta foi retirada após retirada do pontos com 12 dias.

No pós-operatório foram administrados fenilbutazona (4,4 mg/kg IV, SID por 3 dias) e gentamicina (6,6 mg/kg IV, SID por 3 dias) em todos os animais. Os animais foram mantidos em repouso em baia por 3 meses.

5.4 ASPIRADO CONCENTRADO DE MEDULA ÓSSEA

As células tronco mesenquimais foram coletadas da 5ª esternebra no pré-operatório de todos os animais, antes do início do procedimento artroscópico. Os animais foram contidos em brete e sedados com detomidina 1% (0,01 mg/kg IV) associado ao tartarato de butorfanol (0,01 mg/kg IV). Para tal, os animais tiveram uma área central de 10 x 15 cm do esterno preparada com tricotomia. Posteriormente foi realizada antissepsia da região com clorexidine degermante e alcoólico para coleta asséptica da medula óssea. O local de inserção foi exatamente na 5ª esternébra, região de interseção da linha média ventral com a linha paralela aos olecranos. A pele, musculatura e periósteo local foram infiltrados com 10 à 12 mililitros de cloridato de lidocaína à 2 %. Foi preparado um campo estéril de apoio onde estava localizada 1 seringa de 60 ml, 1 agulha 40x8 mm, uma lâmina de bisturi nº 15, gases estéreis e agulha de aspiração de medula óssea de 11G e 15 cm de comprimento modelo Jamshid. Após ter calçado as luvas estéreis, cada seringa de 60 ml foi preenchida com 2 ml de heparina sódica (5000 IU/ml) e 8 ml de soro fisiológico.

O local exato da punção foi definido com auxílio da ultrassonografia com transdutor linear multifrequencial de 6 – 15 MHz, a fim de evitar complicações relativas ao acesso. Após preparo cirúrgico do campo e dos materiais para coleta, foi feita uma punção-incisão com bisturi nº 3 e lâmina nº 15 de pele, celular subcutâneo, musculatura e periósteo para facilitar a inserção da agulha de aspiração. Com o obturador travado, a agulha de aspiração de medula óssea foi inserida através da pele, celular subcutâneo, musculatura e periósteo ficando em contato íntimo com o

corpo da esternébra. Na sequência a agulha foi inserida através do corpo da esternébra com movimentos giratórios até ultrapassar o córtex e penetrar centralmente a cavidade medular. A agulha foi introduzida 3 à 5 mm dentro do osso. Neste momento o obturador foi removido e acoplado seringa de 60 ml contendo heparina. Foi aplicada pressão negativa para confirmação do fluxo. A seguir foram injetados 3 ml de heparina na cavidade medular para prevenir coagulação. Ainda com a seringa acoplada foram aspirados 60 ml de medula óssea com leve pressão negativa (Figura 3). A seringa foi homogeneizada após a coleta para impedir coagulação. Ao final do procedimento de coleta a agulha medular foi removida e firme pressão com gaze estéril foi aplicada sobre o local a fim de realizar hemostasia local. O acesso foi suturado com fio nylon 2-0.

Figura 3 – Coleta de medula óssea da 5ª esternébra com auxílio de cânula para biópsia de medula óssea de 11G X 15 cm e seringa de 60 ml - São Paulo - 2013-14

Fonte: (CARVALHO, 2013-14)-

Após a coleta, as amostras, devidamente acondicionadas em caixa térmica com gelo, foram levadas para processamento em laboratório a fim de separar e concentrar a fração de células mononucleares ricas em células mesenquimais.

Inicialmente a seringa foi homogeneizada e se colocou 60 ml do aspirado em 2 tubos falcon de 50 ml, os quais foram centrifugados (Centrifuga Sorvall RT 6000D) à 1000 x g por 15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e descartado, restando apenas o *pellet* celular. Cada *pellet* foi ressuspendido com 12 ml de solução tampão fosfato estéril de forma a se obter 20 ml totais de cada tudo falcon. A solução resultante foi aspirada e cautelosamente depositada em outros dois tubos falcon de 50 ml previamente preenchidos com 10 ml de ficoll (Histopaque® -1077, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e centrifugada à 400 x g por

25 minutos à 20°C (Figura 4). A zona de névoa foi aspirada e colocada em tubo falcon de 15 ml, adicionou-se 10 ml de PBS estéril e homogeneizou-se. Esta solução foi então centrifugada a 250 x g por 10 minutos à 20°C. Ao término desta centrifugação o sobrenadante foi descartado. O procedimento de lavagem foi repetido outras 2 vezes. Antes de centrifugar a terceira lavagem foi coletado 1 ml e colocado em microtubo para posterior análise da concentração e viabilidade pelo teste da exclusão em azul de Tripán 0,2%, ambas em câmara de Neubauer. Ao término da terceira lavagem o *pellet* concentrado em células mononucleares foi acrescido de 2 ml de PRP concomitantemente preparado. O concentrado de medula óssea acrescida de PRP e a amostra de concentrado de medula óssea foram acondicionados em caixa de isopor com gelo.

Figura 4 – Imagens mostram as etapas da obtenção do concentrado de medula óssea através do método de gradiente de concentração com Ficoll – São Paulo - 2013-14

Fonte: (CARVALHO, 2013-14).

Legenda: **(A)** colocação do ficoll em tubo falcon 50 ml, **(B)** adição cuidadosa do aspirado de medula óssea e **(C)** zona de névoa (Z.N.) concentrada de células mesenquimais após centrifugação.

5.5 PLASMA RICO EM PLAQUETA

Inicialmente foi feita tricotomia e antisepsia da pele no terço médio do pescoço na região da veia jugular direita. Foram coletados 25,6 ml de sangue através de venopunção da veia jugular em 8 tubos plásticos de citrato de sódio a 3,8%. Os tubos foram centrifugados primeiramente à 120 x g por 5 minutos em centrífuga Sorvall RT 6000D. Do plasma sobrenadante foi descartado os 50 % superiores (plasma pobre em plaquetas). Os 50 % restantes, ou seja, fração acima do halo de leucócitos, foram aspirados e acondicionados em tubo falcon de 15 ml e submetidos à nova centrifugação à 660 x g por 10 minutos à 20°C. Os 75 %

superiores foram descartados e os 25 % restantes resultaram no plasma rico em plaquetas (PRP). A contagem das plaquetas foi realizada no sangue total e ao final da preparação de PRP, devendo esta ser igual ou superior à 300.000 plaquetas/ μ l para viabilizar sua utilização. Foi utilizado método manual com câmara de Neubauer espelhada (Neubauer – Hirschmann – EM – Techcolor).

O PRP foi preparado momentos antes da sua aplicação em cada momento, que foi M 0, M 15 e M 30 para cada articulação que recebeu o tratamento. Ao final da preparação foram obtidos 2 ml de PRP, os quais foram adicionados ao concentrado de medula óssea e hialuronato de sódio em M 0, ou seja, foram administrados ao final do procedimento cirúrgico.

Em M 15 e M 30 os 2 ml de PRP foram adicionados a 2 ml de ácido hialurônico (20 mg) e injetados na articulação metacarpofalangeana. Para realização das infiltrações articulares os animais foram contidos em brete de contenção, sedados com detomidina 0,01 mg/kg por via intravenosa. Os membros a serem injetados foram preparados com tricotomia e antissepsia com clorexidine degermante e alcoólico. Os 4 ml a serem injetados estarão contidos em uma seringa de 10 ml. A artrocentese da articulação metacarpofalangeana selecionada para receber o tratamento foi realizada com agulha 40 X 8 mm através do recesso palmar lateral entre o metacarpo e o sesamoide lateral, por sobre o ligamento sesamoideo colateral lateral.

5.6 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO

5.6.1 Exame Físico

Os cavalos foram avaliados clinicamente segundo escala de gradação de claudicação da American Association of Equine Practitioners (AAEP), ou seja, entre 0 e 5 (BAXTER, 2011). Os exames foram realizados imediatamente antes do início do período experimental e em 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210 dias. Foram também avaliados: grau de efusão articular de 0 (normal) à 3 (grave); resposta dolorosa após

flexão articular onde 0 (normal) e 4 (dor severa); mobilidade articular de 0 (normal) à 3 (severamente reduzida).

5.6.2 Avaliação radiográfica

Foi realizado estudo radiográfico de ambas as articulações metacarpofalangeanas com projeções: dorso-palmar, lateromedial, dorsolateral-palmaromedial oblíqua 45°, dorsomedial-palmarolateral oblíqua 45°. Os estudos radiográficos foram realizados avaliados e pontuados segundo escore em M 0, M 60 e M 210 segundo Silva (2014).

Critério 1 – Aumento de tecidos moles: 0= nenhum; 1= pequeno abaulamento tecidual localizado; 2= pequeno abaulamento tecidual difuso; 3= moderado abaulamento tecidual; 4= acentuado abaulamento tecidual; 5= severo abaulamento tecidual envolvendo planos além da área articular.

Critério 2 – Presença de mineralização de tecidos moles: 0= nenhum; 1= suspeito; 2= áreas de estriações difusas ou localizadas; 3= áreas densas localizadas; 4= áreas difusas; 5= áreas difusas e generalizadas além da área articular em estudo.

Critério 3 – Presença de aumento da interlinha radiográfica: 0= normal; 1= suspeito; 2= pequeno; 3= evidente com relação óssea mantida; 4= ampla com perda parcial da relação óssea (subluxação); 5= ampla com perda total da relação óssea (luxação).

Critério 4 – Presença de diminuição da interlinha radiográfica: 0= normal; 1= suspeito; 2= leve estreitamento com orientação simétrica ou assimétrica; 3= moderado estreitamento de forma simétrica ou assimétrica e mantendo a definição; 4= acentuado; 5= indefinição da interlinha radiográfica.

Critério 5 – Evidência de osteófitos e proliferações ósseas: 0= nenhum; 1= discreta projeção óssea localizada em uma das faces 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= severas projeções ósseas irregulares observadas em mais de uma projeção.

Critério 6 – Evidência de enteseófitos: 0= nenhum; 1= leve nebulosidade em topografia de inserção de cápsula articular ou ligamentos articulares; 2= linhas ou discreta ponte de mineralização na topografia de cápsula ou ligamentos; 3= projeção óssea organizada e facilmente reconhecida na topografia de inserção de cápsula ou ligamentos; 4= projeção óssea evidente e irregular na topografia de inserção de cápsula ou ligamentos; 5= severa reação óssea desorganizada na topografia de inserção de cápsula ou ligamentos.

Critério 7 - Presença de esclerose subcondral: 0= nenhuma; 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; 5= evidente esclerose subcondral difusa e estendendo-se para trabeculação óssea.

Critério 8 – Presença de osteólise subcondral: 0= nenhuma; 1= pequenas ondulações na margem subcondral, levemente irregular; 2= erosão superficial localizada do osso subcondral; 3= erosão superficial do osso subcondral generalizada; 4= erosão irregular proeminente ou lesão cística na margem subcondral ou com discreta extensão para epífise; 5= severa erosão ou lesão cística estendendo-se pela epífise.

Critério 9 – Evidência de fragmentos osteocondrais: 0= nenhum; 1= fragmento osteocondral único, sutil, pouco definido e não deslocado; 2= fragmento osteocondral único bem definido e não deslocado; 3= dois fragmentos bem definidos e não deslocados; 4= múltiplos fragmentos no local ou fragmento deslocado.

Critério 10 – Tamanho do fragmento osteocondral: 0= Ausente; 1= menor ou igual a 5 mm; 2= entre 6 a 10 mm; 3= entre 11 a 15 mm; 4= maiores de 15 mm.

5.6.3 Avaliação ultrassonográfica

Foi realizada avaliação ultrassonográfica da articulação metacarpofalangeana de ambos os membros torácicos. Para tal, foi utilizado aparelho Sonoscape S6 Vet com transdutor linear multifrequencial 6-15 MHz. Foi feito o escaneamento dorsal longitudinal (sagital e parasagital) e transversal em diferentes níveis entre os limites

dorsais e distais e também abaxiais laterais e mediais. Para os critérios 7 e 8, foi feita avaliação medial e lateral. As avaliações ultrassonográficas foram pontuadas em M 0, M 15, M 30, M 45, M 60, M 90, M 120, M 210 modificado de Silva (2014).

Critério 1 – Líquido sinovial segundo o aspecto: 0= Anecóico, em quantidade normal; 1= efusão sinovial anecóica; 2= heterogêneo predominando líquido anecóico; 3= predomínio de material amorfo heterogêneo e líquido anecóico; 4= material amorfo heterogêneo e/ou líquido com material denso e com focos hiperreflexivos em suspensão.

Critério 2 – Líquido sinovial segundo sua quantidade: 0= sem alteração; 1= quantidade aumentada em até metade do volume fisiológico (+); 2= quantidade aumentada em até dobro do volume fisiológico (++); 3= quantidade aumentada em mais que o dobro do volume fisiológico (+++); 4= quantidade aumentada em três vezes ou mais do volume fisiológico (++++).

Critério 3 – Cápsula articular segundo sua espessura: 0= sem alteração; 1= espessura pouco aumentada em até 20%, em áreas localizadas (+); 2= aumento da espessura da cápsula em toda sua extensão (++); 3= aumento da espessura da cápsula em mais de 20 % em toda sua extensão(+++).

Critério 4 – Cápsula articular segundo sua inserção: 0= lisa; 1= discreta irregularidade; 2= irregularidade evidente; 3= acentuada irregularidade e fluxo/calibre dos vasos aumentados.

Critério 5 – Cápsula articular segundo aspecto: 0= ecogenicidade homogênea; 1= presença de área hipoecogênica localizada; 2= presença de áreas hipoecogênicas com focos hiperecogênicos;

Critério 6 – 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 lisas, contínuas e detectadas em mais de 50 % da superfície avaliada; 2= linha de cartilagem de difícil identificação, porções observadas descontínua e rugosa; 3= Sem identificação da linha de cartilagem, presença de fragmento no líquido sinovial; 4= ausência de linha de cartilagem e alteração difusa da superfície do osso subcondral.

Critério 7 – Osso subcondral segundo sua superfície: 0= superfície lisa; 1= superfície irregular; 2= presença de áreas de depressão; 3= presença de áreas de depressão com 2 ou mais osteófitos.

Critério 8 – Osso subcondral segundo a presença de osteófitos: 0= borda articular lisa; 1= borda articular rugosa; 2= presença de osteófitos; 3= osteófitos grandes e/ou fragmentados.

5.6.4 Avaliações do líquido sinovial

As coletas foram realizadas através artrocentese com agulha hipodérmica de 30x8 mm e seringa acoplada em seringa de 20 ml. Foi realizada no recesso palmar lateral da articulação metacarpofalangeana em acesso por sobre o ligamento colateral lateral do sesamóide. Previamente estes cavalos foram contidos em brete e tiveram a área preparada para coleta asséptica. As coletas foram realizadas nos mesmos momentos utilizados para fazer todas as avaliações, portanto no transoperatório (M 0) e com 3 (M 3), 5 (M5), 7 (M 7), 15 (M 15), 30 (M 30), 45 (M 45), 60 (M 60), 90 (M 90), 120 (M 120) e 210 (M 210) dias. Foram feitas avaliações físicas, químicas e citológicas do líquido sinovial imediatamente após a coleta. Amostras do líquido sinovial, em todos os momentos após a centrifugação, foram acondicionadas em microtubos de 2 ml em triplicata e mantidas em freezer a – 80°C para determinação da concentração de PGE₂, TNF α , IL-1 β , condroitin sulfato e ácido hialurônico.

5.6.4.1 Contagem total de células

As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 2000 RPM e o sedimento ressuspenso em 1,0 mL de PBS (solução tampão de fosfato), realizando a contagem em câmara de Neubauer (Neubauer – Hirschmann – EM – Techcolor).

5.6.4.2 Avaliação Física

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

5.6.4.3 Determinação de Proteína Total

Para as dosagens de proteína total foi utilizado o sobrenadante retirado após centrifugação da amostra destinada à contagem total de células nucleadas. As dosagens da proteína total foram realizadas com auxílio de um refratômetro previamente calibrado.

5.6.4.4 Avaliação da Viscosidade

A viscosidade do líquido sinovial foi avaliada colocando-se uma gota da amostra no polegar e em seguida se pressionou com dedo indicador. Ao distanciar um dedo do outro observou-se a formação de um fio e quando este se rompia classificava-se em: viscosidade boa (fio ≥ 5 cm), regular (fio < 5 cm e ≥ 2 cm), ruim (fio < 2 cm) e muito ruim (fio igual a zero).

5.6.4.5 Determinação da Uréia

As dosagens de uréia de líquido sinovial foram realizadas pelo método enzimático (urease-glutamato desidrogenase) com a utilização do analisador bioquímico automático (Randox RX Daytona).

5.6.4.6 Determinação da PGE₂

A determinação da concentração prostaglandina E₂ (PGE₂) sinovial foi realizada para todos os grupos em M-0, M-3, M 5, M-7, M-15, M-30, M-45, M-60, M-90, M-120 e M-210, através de teste imunoenzimático utilizando um “kit” ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) comercial (Prostaglandin E₂ EIA Kit – Monoclonal, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EUA).

EIA Buffer foi adicionado aos poços de ligação inespecífica (100µl) e aos poços de máxima ligação (50 µl). A curva padrão foi feita em duplicata, adicionando 50 µl em cada poço das fileiras 2 e 3 da placa. Na sequência, 50 µl das amostras de líquido sinovial foram adicionadas em cada poço, em duplicata, com exceção dos poços de atividade total e branco, todos os demais receberam 50 µl de *PGE₂ tracer*, contendo acetilcolinesterase (AChE). O anticorpo monoclonal anti-PGE₂ foi adicionado na quantidade de 50 µl aos poços, com exceção dos poços de atividade total, ligação inespecífica e branco. A placa foi encubda por 18 horas a 4°C e em seguida lavada cinco vezes com *Tampão de lavagem* em lavadora automática (405 LS – Biotec). Foram acondicionados 200 µl de *Ellman’s Reagent*, preparado imediatamente antes da sua utilização, em todos os poços, e apenas o poço de atividade total recebeu também 5 µl de *tracer*. A placa foi protegida da luz e mantida em agitador automático (MiniShaker PSU-2T – Biosan) por 60 a 90 minutos (MOREIRA, 2013).

A absorbância da amostra foi lida entre 405 e 420 nm em um leitor de ELISA (Elx808 – Biotek) e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 7,8 a 1000 pg/ml pelo program Gen 5.

5.6.4.7 Determinação de TNFα

Para avaliação da concentração de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) foi utilizado método ELISA, através do *kit* Equine TNFα – Duo Set (Ref: DY 1814), adquirido da empresa R&D Systems. Todas as amostras de líquido sinovial foram pré-tratadas com *Hyaluronidase from bovine testis* (Sigma Chemical, St Louis, MO,

USA) 0,1 mg/ml em inibidor de protease Fenilmetanosulfonil Fluoreto – PMSF (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) 2 mmol/L a 37°C por 30 minutos segundo protocolo descrito e validado Grauw et al. (2006).

A placa foi previamente sensibilizada pela adição de 100 µl de anticorpo de captura (anti-TNFα) em todos os poços. Após incubação *overnight* em temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes com 300 µl de tampão de lavagem/poço em cada lavagem. A placa foi bloqueada pela adição de 100 µl de *Reagente Diluent* em cada poço, incubada em temperatura ambiente por pelo menos 60 minutos, e lavada três vezes com 300 µl de *tampão de lavagem/poço* em cada lavagem. Foram adicionados 100 µl de cada amostra, em duplicata, e também 100 µl do padrão. Após incubação por 120 minutos em temperatura ambiente, a placa foi e lavada três vezes com 300 µl de *tampão de lavagem/poço* em cada lavagem, e foram adicionados 100 µl de anticorpo de detecção (anti-TNFα) em cada poço. A placa foi incubada por 120 minutos em temperatura ambiente, e lavada três vezes com 300 µl de *tampão de lavagem/poço* em cada lavagem e 100 µl de estreptavidina peroxidase foram adicionados em todos os poços. Após incubação por 20 minutos protegida da luz e em temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes com 300 µl de *tampão de lavagem/poço* em cada lavagem. Foram adicionados 100 µl de solução de substrato em cada poço, e, após incubação em temperatura ambiente e protegida de luz, a placa recebeu 50 µl de solução de parada em cada poço. A placa foi lida a 450 nm em leitor de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 15,6 a 1000 pg/ml pelo programa Gen 5.

5.6.4.8 Determinação de IL-1β

A concentração de interleucina 1β (IL-1β) foi avaliada pelo método de ELISA, através do *kit* Equine IL-1β – Duo Set (Ref: DY 3340), adquirido da empresa R&D Systems.

Previamente ao ensaio, todas as amostras de líquido sinovial foram pré-tratadas com *Hyaluronidase from bovine testis* (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) 0,1 mg/ml em inibidor de protease Fenilmetanosulfonil Fluoreto – PMSF (Sigma

Chemical, St Louis, MO, USA) 2 mmol/L a 37°C por 30 minutos segundo protocolo descrito e validado Grauw et al. (2006).

A placa foi previamente sensibilizada pela adição de 100 µl de anticorpo de captura (anti- IL-1β) em todos os poços. Após incubação *overnight* em temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes com 300 µl de tampão de lavagem/poço em cada lavagem. A placa foi bloqueada pela adição de 100 µl de *Reagente Diluent* em cada poço, incubada em temperatura ambiente por pelo menos 60 minutos, e lavada adicionados 100 µl de cada amostra, em duplicata, e também 100 µl do padrão. Após incubação por 120 minutos em temperatura ambiente, a placa foi e lavada três vezes com 300 µl de tampão de lavagem/poço em cada lavagem, e foram adicionados 100 µl de anticorpo de detecção (anti- IL-1β) em cada poço. A placa foi incubada por 120 minutos em temperatura ambiente, e lavada três vezes com 300 µl de tampão de lavagem /poço em cada lavagem e 100 µl de estreptavidina peroxidase foram adicionados em todos os poços. Após incubação por 20 minutos protegida da luz e em temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes com 300 µl de tampão de lavagem /poço em cada lavagem. Foram adicionados 100 µl de solução de substrato em cada poço, e, após incubação em temperatura ambiente e protegida de luz, a placa recebeu 50 µl de solução de parada em cada poço. A placa foi lida a 450 nm em leitor de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 62,5 a 8000 pg/ml pelo programa Gen 5.

As análises pelo método ELISA foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP e utilizaram-se amostras de líquido sinovial dos diferentes momentos acondicionadas em microtubos de 2 ml sem anticoagulante a -80°C.

3.6.4.9 Determinação dos Glicosaminoglicanos

Para avaliar a concentração de glicosaminoglicanos (GAGs) no líquido sinovial foi utilizado método de eletroforese em gel de agarose conforme descrito por Machado et al. (2012)

Para tal, utilizaram-se as amostras acondicionadas em microtubos sem anticoagulante a -80°C.

Foi adicionado 50 µl de cada amostra em 100 µl de protease alcalina P126 maxatase (4mg/ml Tris HCl 0,05 M) e incubados em banho-maria a 50°C, *over night*. No dia seguinte, as amostras foram fervidas durante 15 minutos e centrifugadas (Centrífuga 5418 - Eppendorf®) em temperatura ambiente a 300 x g por 15 minutos para remoção de resíduos insolúveis. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 600 µl e seco em vácuo (Vacufuge vacuum concentrator - Eppendorf®) por 150 minutos a 45°C. As amostras foram ressuspensas em 25 µl de água destilada.

As amostras foram então submetidas a eletroforese em gel de agarose, em tampão 1,3 diaminopropano-acetato 0,05M e pH 9 (PDA), em cuba refrigerada, por aproximadamente uma hora. Foram utilizados 5 µl de um padrão de condroitin sulfato (CS) e de um padrão de ácido hialurônico (AH), ambos na concentração de 1 mg/ml. O corante vermelho de cresol foi adicionado como indicador da distância percorrida.

Após a eletroforese os GAGs foram fixados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1 % pelo tempo mínimo de duas horas. Em seguida o gel foi coberto com papel filtro e seco sob corrente de ar aquecida. O CS foi corado com azul de toluidina 0,1 % em solução de ácido acético 1% e etanol 50 % por 15 minutos. O excesso de corante foi removido pela solução de ácido acético 1 % em etanol 50%. Ato contínuo o AH foi corado com azul de toluidina 0,1 % em acetato de sódio 0,025 M pH 5 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M.

As lâminas foram escaneadas (Epson Expression 1680®) e as imagens editadas (Laund Silver Fast Epson IT8®) para análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas (Lauch Vision WorksLS®) (Figura 5).

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose de GAGs do LS coletado da articulação metacarpofalangeana durante os momentos 3, 5, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 210 dias do grupo controle. CS: CS padrão, 5 µg.; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo – 2013-14

Fonte: (CARVALHO, 2013-14).

5.6.5 Avaliações macroscópicas

Para avaliação macroscópica do reparo em M210 foi utilizado escore macroscópico ICRS (International Cartilage Repair Society) (BORNE et al., 2007). Para tal, foi realizada artroscopia de ambas articulações metacarpofalangeana das peças colhidas no abatedouro. As peças foram coletadas, colocadas em caixa de isopor com gelo e o exame foi realizado 30 minutos após a coleta.

Os seguintes critérios foram considerados na avaliação macroscópica ICRS:

Critério 1 – Grau de reparo do defeito: 4= Mesmo nível da cartilagem ao redor; 3= 75 % de reparo da profundidade do defeito; 2= 50 % de reparo da profundidade do defeito; 1= 25% de reparo da profundidade do defeito; 0= 0% de reparo da profundidade do defeito.

Critério 2 – Grau de integração na zona de borda: 4= Completa integração com a cartilagem ao redor; 3= demarcação menor que 1 mm; 2= 75% de integração do tecido de reparo, 25% com borda notável maior que 1 mm; 1= 50% de integração de borda e 50 % com borda notável maior que 1 mm; 0= menos de 25% de integração entre bordas.

Critério 3 - Aparência macroscópica: 4= superfície lisa intacta; 3= superfície fibrilada; 2= Pequenas fissuras ou buracos; 1= Poucas, porém grandes ou graves fissuras; 0= Degeneração total da área de reparo.

Critério 4 – Avaliação global do reparo, através da soma dos escores: 12= grau 1 ou normal; 11 à 8= grau 2 ou quase normal; 7 à 4= grau 3 ou anormal; 3 à 0= grau 4 ou gravemente anormal.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis com distribuição normal foram comparadas pelo testes t de Student pareado para a comparação das médias dos grupos tratamento e controle. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar os dias após o início dos tratamentos, foi considerado estatisticamente significando quando $p < 0,05$.

Nas variáveis que não obtiveram uma distribuição normal, foram aplicados testes não paramétricos. Para as variáveis dependentes, onde em cada animal foi possível avaliar tratamento e controle, foi utilizado o teste Wilcoxon com significância estabelecida a $p < 0,05$. Dentro do tratamento e controle, a diferença observada nas variáveis dependentes, dias após início do tratamento, foi utilizado o teste de Friedman assumindo uma significância estatística quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico Minitab versão 16 (Minitab Inc, State College, PA, USA).

6 RESULTADOS

O presente estudo foi inicialmente desenvolvido com 6 animais, os quais foram divididos em duas etapas afim de viabilizar a realização de todos os procedimentos. O último animal da segunda etapa apresentou insuficiência renal aguda oligúrica com 5 dias de pós-operatório e necessitou ser retirado do experimento. Portanto os resultados apresentados a seguir se referem a 5 animais.

6.1 OBTENÇÃO DO ASPIRADO CONCENTRADO DE MEDULA ÓSSEA

A técnica de obtenção do aspirado de medula óssea foi facilmente realizada e obteve-se 60 ml de todos os animais. Foi possível notar em todos os aspirados gotículas de gordura e espículas ósseas o que comprovou a origem medular do sangue colhido. O número médio total de células mononucleares foi de $67,2 \times 10^6$ com viabilidade média de 98,14% (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração e viabilidade em azul de tripan 0,2% de células mononucleares totais obtidas do aspirado de medula óssea após processamento em gradiente de concentração– São Paulo – 2013-14

Variável	A1	A2	A3	A4	A5	Média	DP
Concentração de células mononucleares ($\times 10^6$)	106,00	114,00	50,00	36,00	30,00	67,20	34,24
Viabilidade em azul de tripan 0,2% (% de viab.)	100	97,37	100	100	93,33	98,14	2,23

DP – Desvio padrão.

6.2 OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Notou-se que o protocolo de centrifugação utilizado para obtenção de plasma rico em plaquetas obteve um valor mínimo de 360.000 e um valor máximo de

1.200.000 plaqueta por microlitro, com média geral de 590.667 plaquetas por microlitro (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração de plaquetas obtidas após método de centrifugação para obtenção de plasma rico em plaquetas de cada animal em todos os momentos – São Paulo – 2013-14

Momento	A1	A2	A3	A4	A5	Média
M0	570.000	1.240.000	430.000	370.000	680.000	658.000
M3	420.000	830.000	360.000	800.000	400.000	562.000
M5	380.000	600.000	580.000	640.000	560.000	552.000
Média	456.667	890.000	456.667	603.333	546.667	590.667

6.3 EXAME FÍSICO

Os escores associados ao exame físico não apontaram diferenças estatisticamente significante ($p>0,05$) entre o grupo tratado e o grupo controle. No entanto, ao se avaliar os momentos, foram observadas diferenças no grupo tratado para as variáveis claudicação, dor a flexão passiva, mobilidade articular e volume articular ($p<0,05$), com piora nas medianas dos escores notável entre 15 e 60 dias. Já no grupo controle apenas o volume articular apresentou diferença entre os dias (Tabela 3 – 6). Os dados referentes ao exame físico estão no apêndice A e B.

Tabela 3 – Escores de claudicações dos grupos tratamento e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14

Variável	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Claudicação					
M0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
M15	1,2 ± 1,3	1	0 ± 0	0	0,181
M30	1,4 ± 1,3	2	0 ± 0	0	0,181
M45	0,8 ± 0,8	1	0 ± 0	0	0,181
M60	0,4 ± 0,5	0	0 ± 0	0	0,371
M90	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
M120	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
M210	0,2 ± 0,4	0	0,3 ± 0,5	0	1
Valor de P	0,021		0,429		

NA – não se aplica.

Tabela 4 - Escores de dor a flexão passiva dos grupos tratamento e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14

Variável	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Dor a flexão passiva					
M0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
M15	1,4 ± 0,9	2	0,5 ± 0,6	0	0,1
M30	1,4 ± 1,1	1	0 ± 0	0	0,1
M45	1,2 ± 1,3	1	0 ± 0	0	0,181
M60	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
M90	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
M120	0,4 ± 0,5	0	0,3 ± 0,5	0	1
M210	0,2 ± 0,4	0	0,3 ± 0,5	0	1
Valor de P	0,005		0,281		

NA – Não se aplica

Tabela 5 - Escores de mobilidade articular dos grupos tratamento e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14

	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Mobilidade					
Articular					
M0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
M15	0,8 ± 0,8	1	0 ± 0	0	0,181
M30	0,8 ± 0,8	1	0 ± 0	0	0,181
M45	1 ± 0,7	1	0 ± 0	0	0,1
M60	0,4 ± 0,5	0	0 ± 0	0	0,371
M90	0,4 ± 0,5	0	0 ± 0	0	0,371
M120	0,4 ± 0,5	0	0 ± 0	0	0,371
M210	0,4 ± 0,5	0	0 ± 0	0	0,371
Valor de P	0,039		1		

NA – não se aplica

Tabela 6 – Escores de volume articular dos grupos tratamento e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14

	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Volume articular					
M0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
M15	1 ± 0	1	0,8 ± 0,5	1	1
M30	0,8 ± 0,4	1	0,8 ± 1,5	0	1
M45	1,2 ± 0,4	1	0,3 ± 0,5	0	0,059
M60	0,8 ± 0,4	1	0 ± 0	0	0,1
M90	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
M120	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
M210	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	<0,001		0,005		

NA – Não se aplica.

6.4 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Na avaliação radiográfica não houve diferença estatística entre o controle e o tratamento ($p > 0,05$), enquanto na verificação de evidências de enteseófito foi observado no grupo tratado aumento significativo ($p = 0,047$) da sua presença conforme passaram-se os dias (Tabela 7 - 9, Figura 6). Em 1 articulação do grupo tratado houve fragmentação do osso subcondral.

No estudo radiográfico não foi possível notar a presença do defeito de cartilagem nas imagens obtidas. Os dados obtidos estão no apêndice C.

Tabela 7 - Escores das avaliações radiográficas dos grupos tratado e controle, atribuídos a variável aumento de tecidos moles nos dias 0, 60 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14

	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Aumento tecidos moles					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	0,6 ± 0,9	0	0 ± 0	0	0,371
Dia 210	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	0,135		1,0		

NA – Não se aplica

Tabela 8 - Escores das avaliações radiográficas dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis Mineralização dos tecidos moles, Aumento da interlinha radiográfica, Diminuição da interlinha radiográfica, Evidência de osteófitos e proliferação óssea, Evidência de enteseófito, Esclerose subcondral e Osteólise subcondral nos dias 0, 60 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P- São Paulo – 2013-14

	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Mineralização dos tecidos moles					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	1,0		1,0		
Aumento da interlinha radiográfica					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	1,0		1,0		
Diminuição da interlinha radiográfica					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	1,0		1,0		
Evidência de osteófitos e proliferação óssea					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	0,2 ± 0,4	0	0,2 ± 0,4	0	NA
Valor de P	0,368		0,368		
Evidência de enteseófito					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	1,4 ± 1,1	1	0,6 ± 0,5	1	0,371
Dia 210	1,2 ± 0,4	1	1 ± 0,7	1	1
Valor de P	0,047		0,142		
Esclerose subcondral					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	1,0		1,0		
Osteólise subcondral					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	0,4 ± 0,9	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	0,368		1,0		

Tabela 9 - Escores das avaliações radiográficas dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis Fragmentos osteocondrais e Tamanho fragmento osteocondral nos dias 0, 60 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P- São Paulo – 2013-14

	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Fragmentos osteocondrais					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	0,8 ± 1,8	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	0,368		1,0		
Tamanho fragmento osteocondral					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	1,0		1,0		

NA – Não se aplica.

Figura 6 – Imagens radiográficas demonstrando, após 210 dias (M210), presença de enteseófito no bordo dorsal proximal da primeira falange (seta) no animal A1 no membro anterior esquerdo ao qual pertencia ao grupo tratamento- São Paulo - 2013-14

Fonte: (CARVALHO, 2013-14).

6.5 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

Os dados referentes a avaliação ultrassonográfica encontram-se nos apêndices D, E e F. Quando avaliado o escore das alterações pelo exame ultrassonográfico, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre OS

grupos tratamento e controle das variáveis analisadas. No entanto, houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os dias para as variáveis quantidade do líquido sinovial e espessura, inserção e aspecto da cápsula articular do grupo tratamento (Figura 7). No grupo controle essas alterações foram observadas apenas nas variáveis inserção e aspecto da capsula articular (Tabela 10).

Figura 7 – Imagem ultrassonográfica da articulação metacarpofalangeana do animal A2 nos momentos 0 e 45 dias – São Paulo – 2013-14

Fonte: (CARVALHO, 2013-14).

Legenda: Nas imagens ultrassonográficas A1 e A2 é possível nota-se imagem ultrassonográfica normal em M0. Já no M45 nota-se que em B1 há aumento da quantidade de líquido sinovial e espessamento de cápsula articular, e em B2 Nota-se heterogeneidade da cápsula articular, ausência de cartilagem no côndilo medial do metacarpo (Seta).

Tabela 10 – Escores das avaliações ultrassonográficas dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14

(Continua)

Variável	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Líquido sinovial (Aspecto)					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	0,789
Dia 15	0,6 ± 0,5	1	0,5 ± 0,6	0	0,371
Dia 30	0,4 ± 0,5	0	0 ± 0	0	0,371
Dia 45	0,4 ± 0,5	0	0 ± 0	0	0,371
Dia 60	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
Dia 90	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 120	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA

(Conclusão)

Variável	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Líquido sinovial (Aspecto)					
Valor de P	0,064		0,051		
Líquido sinovial (Quantidade)					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 15	0,8 ± 0,8	1	0,5 ± 0,6	0	0,465
Dia 30	0,6 ± 0,5	1	0 ± 0	0	0,181
Dia 45	0,6 ± 0,5	1	0 ± 0	0	0,181
Dia 60	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
Dia 90	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 120	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	0,022		0,051		
Cápsula articular (Espessura)					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 15	1,8 ± 1,1	2	0,8 ± 1	1	0,371
Dia 30	2,2 ± 0,4	2	1 ± 1,2	2	0,371
Dia 45	1,8 ± 0,4	2	0,8 ± 1	1	0,361
Dia 60	1,8 ± 1,1	2	0,8 ± 1	1	0,371
Dia 90	1,6 ± 1,1	2	0,5 ± 1	0	0,371
Dia 120	1 ± 1	1	0,8 ± 1	1	0,789
Dia 210	1 ± 1	1	0,8 ± 1	1	1
Valor de P	0,002		0,429		
Cápsula articular (Inserção)					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 15	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 30	0,2 ± 0,4	0	0,8 ± 0,5	1	0,371
Dia 45	0,6 ± 0,5	1	0,5 ± 0,6	0	0,789
Dia 60	1,2 ± 0,8	1	0,5 ± 0,6	1	0,361
Dia 90	1,2 ± 0,8	1	0,5 ± 0,6	1	0,371
Dia 120	1,6 ± 1,1	2	1,3 ± 0,5	1	0,59
Dia 210	1 ± 1	1	1 ± 0,8	1	1
Valor de P	0,008		0,02		
Cápsula articular (Aspecto)					
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 15	1,4 ± 0,9	2	0,8 ± 0,5	1	0,371
Dia 30	1,6 ± 0,5	2	1 ± 0	1	0,371
Dia 45	1,6 ± 0,5	2	1 ± 0	1	0,371
Dia 60	1 ± 0,7	1	0,5 ± 0,6	1	1
Dia 90	0,8 ± 0,8	1	0,5 ± 0,6	1	1
Dia 120	0,6 ± 0,9	0	0,8 ± 1	1	0,593
Dia 210	0,4 ± 0,5	0	0,5 ± 0,6	0	1
Valor de P	0,001		0,028		

NA: Não aplicável. Medianas seguidas de letras diferentes apresentam significância estatística, minúscula na linha pelo teste de Wilcoxon e maiúscula na coluna pelo teste de Friedman, quando o valor de P < 0,05. Escore: Aspecto e qualidade do líquido sinovial (0 – 4); Espessura e inserção da cápsula articular (0 – 3); Aspecto da cápsula articular (0 – 2).

Pelo ultrassom também foram avaliadas as porções mediais e laterais de cada membro, nas quais não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) tanto dentro do grupo tratamento quando do grupo controle. No entanto, foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$) entre os dias da porção medial do grupo tratamento para as variáveis superfície articular e presença de osteófitos do osso subcondral. No grupo controle as diferenças estatísticas ($p<0,05$) entre os dias ocorreram para as variáveis superfície articular (porção medial), superfície do osso subcondral (porção medial) e presença de osteófitos do osso subcondral (porção lateral) (Tabela 11).

Tabela 11 – Escores das avaliações ultrassonográficas dos grupos tratado e controle, cada qual separado pelas porções mediais e laterais, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14.

(Continua)

Variável	Tratamento				Valor de P	Controle				Valor de P
	Medial		Lateral			Medial		Lateral		
	M ± DP	Mediana	M ± DP	Mediana		M ± DP	Mediana	M ± DP	Mediana	
Superfície articular										
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 15	3 ± 0	3	0 ± 0	0	0,059	3 ± 0	3	0 ± 0	0	0,059
Dia 30	3 ± 0	3	0,2 ± 0,4	0	0,059	3 ± 0	3	0 ± 0	0	0,059
Dia 45	2,6 ± 0,5	3	0 ± 0	0	0,059	2,8 ± 0,4	3	0 ± 0	0	0,059
Dia 60	2,8 ± 0,8	3	0 ± 0	0	0,059	2,8 ± 0,4	3	0 ± 0	0	0,059
Dia 90	2,4 ± 0,5	2	0,2 ± 0,4	0	0,059	2,8 ± 0,4	3	0 ± 0	0	0,059
Dia 120	2,2 ± 0,4	2	0,2 ± 0,4	0	0,059	2,6 ± 0,5	3	0 ± 0	0	0,059
Dia 210	2 ± 0,7	2	0,2 ± 0,4	0	0,059	2,4 ± 0,5	2	0 ± 0	0	0,059
Valor de P	0,0005		0,749			0,043		1		
Osso subcondral (superfície)										
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 15	2,2 ± 0,8	2	0 ± 0	0	0,059	2,2 ± 0,8	2	0 ± 0	0	0,059
Dia 30	2,2 ± 0,8	2	0 ± 0	0	0,059	2,2 ± 0,8	2	0 ± 0	0	0,059
Dia 45	2,4 ± 0,5	2	0 ± 0	0	0,059	2,4 ± 0,5	2	0 ± 0	0	0,059
Dia 60	2,4 ± 0,5	2	0 ± 0	0	0,059	2,4 ± 0,5	2	0 ± 0	0	0,059
Dia 90	2,2 ± 0,8	2	0 ± 0	0	0,059	2,2 ± 0,8	2	0 ± 0	0	0,059
Dia 120	2,6 ± 0,9	3	0 ± 0	0	0,059	1,6 ± 0,9	1	0 ± 0	0	0,059
Dia 210	2,4 ± 0,9	3	0 ± 0	0	0,059	1,6 ± 0,9	1	0 ± 0	0	0,059

(Conclusão)

Variável	Tratamento				Valor de P	Controle				Valor de P
	Medial		Lateral			Medial		Lateral		
	M ± DP	Mediana	M ± DP	Mediana		M ± DP	Mediana	M ± DP	Mediana	
Valor de P	0,078		1			0,001		1		
Osso subcondral (osteófitos)										
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 15	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 30	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1	0,4 ± 0,5	0	0 ± 0	0	0,371
Dia 45	0,8 ± 0,8	1	0 ± 0	0	0,181	0,4 ± 0,5	0	0 ± 0	0	0,371
Dia 60	0,8 ± 0,8	1	0 ± 0	0	0,181	0,4 ± 0,5	0	0,2 ± 0,4	0	1
Dia 90	0,8 ± 0,8	1	0 ± 0	0	0,181	0,4 ± 0,5	0	0,2 ± 0,4	0	1
Dia 120	0,8 ± 0,8	1	0,2 ± 0,4	0	0,181	0,8 ± 0,8	1	0,6 ± 0,5	1	0,789
Dia 210	0,8 ± 0,8	1	0,2 ± 0,4	0	0,181	1 ± 0,7	1	0,6 ± 0,5	1	0,465
Valor de P	0,028		0,429			0,069		0,018		

NA: Não aplicável.

Medianas seguidas de letras diferentes apresentam significância estatística, minúscula na linha pelo teste de Wilcoxon e maiúscula na coluna pelo teste de Friedman, quando o valor de P < 0,05.

Escore: Superfície articular (0 – 4); Superfície do osso subcondral (0 – 2); Osteófitos do osso subcondral (0 – 3).

Quando comparado os grupos tratado e controle dentro das porções medial e lateral, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) para as avaliações ultrassonográficas (Tabela 12).

Tabela 12 – Escores das avaliações ultrassonográficas das porções medial e lateral dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210, com valores das médias ± desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14

(Continua)

Variável	Medial				Valor de P	Lateral				Valor de P
	Tratamento		Controle			Tratamento		Controle		
	M ± DP	Mediana	M ± DP	Mediana		M ± DP	Mediana	M ± DP	Mediana	
Superfície articular										
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 15	3 ± 0	3	3 ± 0	3	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 30	3 ± 0	3	3 ± 0	3	NA	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
Dia 45	2,6 ± 0,5	3	2,8 ± 0,4	3	1	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	2,8 ± 0,8	3	2,8 ± 0,4	3	1	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 90	2,4 ± 0,5	2	2,8 ± 0,4	3	0,371	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
Dia 120	2,2 ± 0,4	2	2,6 ± 0,5	3	0,371	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
Dia 210	2 ± 0,7	2	2,4 ± 0,5	2	0,593	0,2 ± 0,4	0	0 ± 0	0	1
Valor de P	0,0005		0,043			0,749		1		

(Conclusão)

Variável	Medial				Valor de P	Lateral				Valor de P
	Tratamento		Controle			Tratamento		Controle		
	M ± DP	Mediana	M ± DP	Mediana		M ± DP	Mediana	M ± DP	Mediana	
Osso subcondral (superfície)										
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 15	2,2 ± 0,8	2	2,2 ± 0,8	2	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 30	2,2 ± 0,8	2	2,2 ± 0,8	2	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 45	2,4 ± 0,5	2	2,4 ± 0,5	2	1	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	2,4 ± 0,5	2	2,4 ± 0,5	2	1	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 90	2,2 ± 0,8	2	2,2 ± 0,8	2	1	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 120	2,6 ± 0,9	3	1,6 ± 0,9	1	0,181	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 210	2,4 ± 0,9	3	1,6 ± 0,9	1	0,273	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Valor de P	0,078		0,001			1		1		
Osso subcondral (osteófitos)										
Dia 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 15	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 30	0,2 ± 0,4	0	0,4 ± 0,5	0	1	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 45	0,8 ± 0,8	1	0,4 ± 0,5	0	1	0 ± 0	0	0 ± 0	0	NA
Dia 60	0,8 ± 0,8	1	0,4 ± 0,5	0	1	0 ± 0	0	0,2 ± 0,4	0	1
Dia 90	0,8 ± 0,8	1	0,4 ± 0,5	0	1	0 ± 0	0	0,2 ± 0,4	0	1
Dia 120	0,8 ± 0,8	1	0,8 ± 0,8	1	NA	0,2 ± 0,4	0	0,6 ± 0,5	1	0,371
Dia 210	0,8 ± 0,8	1	1 ± 0,7	1	1	0,2 ± 0,4	0	0,6 ± 0,5	1	0,371
Valor de P	0,028		0,069			0,429		0,018		

NA: Não aplicável.

Medianas seguidas de letras diferentes apresentam significância estatística, minúscula na linha pelo teste de Wilcoxon e maiúscula na coluna pelo teste de Friedman, quando o valor de P < 0,05.

Escore: Superfície articular (0 – 4); Superfície do osso subcondral (0 – 2); Osteófitos do osso subcondral (0 – 3).

6.6 AVALIAÇÕES DO LÍQUIDO SINOVAL

6.6.1 Contagem total de células nucleadas

A comparação da contagem de células totais do líquido sinovial entre o grupo tratado e controle não apresentou significância estatística ($p > 0,05$) (Tabela 13).

Os dados referentes aos valores das células nucleadas totais no líquido sinovial encontram-se no apêndice G. Notou-se que em diversos momentos houve contaminação por sangue, portanto, não foi feita a contagem de células nucleadas totais no líquido sinovial onde ocorreu.

Tabela 13 – Contagem total de células nucleadas dos grupos tratado e controle, com valores das médias $\pm$ desvio padrão e valor de P – São Paulo - 2013-14.

Variável	Tratamento	Controle	Valor de P
	Média ± DP	Média ± DP	
Células totais do líquido sinovial			
Dia 0	450 ± 129,1	500 ± 360,6	0,6220
Dia 3	6966,7 ± 5851,8	1600 ± 755	0,2100
Dia 5	1600 ± 1414,2	2266,7 ± 1701	0,8385
Dia 7	2166,7 ± 1650,3	2080 ± 3874,5	0,7981
Dia 15	1700 ± 989,9	460 ± 305	0,3341
Dia 30	860 ± 811,2	680 ± 476,4	0,7467
Dia 45	766,7 ± 635,1	966,7 ± 702,4	0,3675
Dia 60	500	333,3 ± 251,7	NA
Dia 90	400	300 ± 282,8	NA
Dia 120	200	150 ± 70,7	NA
Valor de P	0,097	0,706	

NA: Não aplicável.

6.6.2 Avaliação física

Os dados referentes aos escores das avaliações físicas do líquido sinovial encontram-se no apêndice H.

Na avaliação laboratorial das variáveis cor, viscosidade e aspecto do líquido sinovial não foi observada diferenças estatísticas ($p > 0,05$) (Tabela 14).

Ao avaliar as medianas notou-se tendência a alteração de cor no grupo controle até 7 dias, posteriormente, o líquido sinovial permaneceu com a cor inalterada. Já no grupo tratamento observou-se que as medianas dos escores para cor elevaram-se até 45 dias de pós-operatório e diminuíram até 120 dias voltando ao escore 1 (normal).

De maneira semelhante à cor, ao avaliar a mediana dos escores do aspecto do líquido sinovial verificou-se aumento notável até 45 dias no grupo tratamento, porém, no grupo controle o aumento foi notado até o dia 5. Em ambos os grupos o aspecto do líquido sinovial retornou ao normal, ou seja, escore 1 ao final do período experimental com 210 dias.

Notavelmente, a mediana do grupo tratamento apresentou pior viscosidade do que o grupo controle aos 3 dias. Posteriormente, no dia 5, ambos os grupos igualaram os escores, com o grupo tratamento apresentou leve melhora e o grupo controle leve piora, o que se manteve no dia 7. No dia 15, ambos os grupos apresentaram escore 4, ou seja, ausência de viscosidade. Neste momento foi feita uma nova infiltração de PRP + AH no grupo tratamento e AH + soro fisiológico no grupo controle. Após a terceira e última infiltração articular, apesar do grupo tratamento ter demorado um pouco mais para apresentar melhora, ambos os grupos apresentaram dinâmica semelhante e com 210 dias a viscosidade apresentava-se boa, ou seja, maior que 5 cm.

Tabela 14 – Escores das avaliações físicas relativas ao líquido sinovial dos grupos tratado e controle atribuídos as variáveis nos dias 0, 3, 5, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 210 com valores das médias $\pm$ desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14

					(continua)
Líquido Sinovial	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Cor					
Dia 0	1 ± 0	1	1 ± 0	1	NA
Dia 3	2 ± 0,8	2	2,3 ± 1	2,5	1
Dia 5	2 ± 0,7	2	2 ± 0,8	2	1
Dia 7	2 ± 0	2	1,8 ± 0,5	2	1
Dia 15	2,3 ± 0,5	2	1,5 ± 0,6	1	0,371
Dia 30	1,6 ± 0,5	2	1,5 ± 0,6	1	1
Dia 45	2,2 ± 1,1	3	1,5 ± 1	1	0,371
Dia 60	1,8 ± 0,8	2	1,5 ± 1	1	0,371
Dia 90	1,5 ± 0,7	1,5	1,5 ± 0,7	1,5	NA
Dia 120	1,4 ± 0,5	1	1,5 ± 1	1	1
Dia 210	1,2 ± 0,4	1	1 ± 0	1	1
Aspecto					
Dia 0	1 ± 0	1	1 ± 0	1	NA
Dia 3	2,5 ± 1	3	2,5 ± 0,6	2,5	1
Dia 5	2,4 ± 0,9	3	1,5 ± 0,6	2	0,1
Dia 7	2 ± 0	2	1,5 ± 0,6	1	0,371
Dia 15	2 ± 0,8	2	1 ± 0	1	0,181
Dia 30	1,2 ± 0,4	1	1,3 ± 0,5	1	1
Dia 45	2,2 ± 1,1	3	1,3 ± 0,5	1	0,181
Dia 60	1,6 ± 0,9	1	1,5 ± 1	1	1
Dia 90	1 ± 0	1	1,5 ± 0,7	1,5	1
Dia 120	1,2 ± 0,4	1	1,3 ± 0,5	1	1
Dia 210	1 ± 0	1	1 ± 0	1	NA

(conclusão)

Líquido Sinovial	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Cor					
Dia 0	1 ± 0	1	1 ± 0	1	NA
Dia 3	4 ± 0	4	2,5 ± 0,6	2,5	0,1
Dia 5	3 ± 0	3	3 ± 0	3	NA
Dia 7	3 ± 0	3	3 ± 0	3	Na
Dia 15	4 ± 0	4	4 ± 0	4	NA
Dia 30	3,2 ± 0,4	3	3,3 ± 0,5	3	0,789
Dia 45	2,6 ± 0,5	3	2,3 ± 0,5	2	0,787
Dia 60	2 ± 0	2	1,8 ± 0,5	2	1
Dia 90	1,5 ± 0,7	1,5	1,5 ± 0,7	1,5	NA
Dia 120	2,2 ± 0,4	2	1,5 ± 0,6	2	0,371
Dia 210	1,2 ± 0,4	1	1,3 ± 0,5	1	1
Viscosidade					
Dia 0	1 ± 0	1	1 ± 0	1	NA
Dia 3	4 ± 0	4	2,5 ± 0,6	2,5	0,1
Dia 5	3 ± 0	3	3 ± 0	3	NA
Dia 7	3 ± 0	3	3 ± 0	3	Na
Dia 15	4 ± 0	4	4 ± 0	4	NA
Dia 30	3,2 ± 0,4	3	3,3 ± 0,5	3	0,789
Dia 45	2,6 ± 0,5	3	2,3 ± 0,5	2	0,787
Dia 60	2 ± 0	2	1,8 ± 0,5	2	1
Dia 90	1,5 ± 0,7	1,5	1,5 ± 0,7	1,5	NA
Dia 120	2,2 ± 0,4	2	1,5 ± 0,6	2	0,371
Dia 210	1,2 ± 0,4	1	1,3 ± 0,5	1	1

NA: Não aplicável.

Medianas seguidas de letras diferentes apresentam significância estatística, minúscula na linha pelo teste de Wilcoxon, quando o valor de $P < 0,05$.

6.6.3 Determinação da uréia

Os dados referentes a concentração de uréia no líquido sinovial encontram-se no apêndice I.

Nas avaliações laboratoriais foi observada diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) no dia 90 quando avaliada a uréia, com o grupo tratamento apresentando $27,9 \pm 6,2$ mg/dL e grupo controle $22,6 \pm 7,2$ mg/dL (Tabela 15).

(Conclusão)

Variável	Tratamento	Controle	Valor de P
	Média ± DP	Média ± DP	
Proteína corrigida por uréia			
Dia 7	83,6 ± 25,8	39,7 ± 28,2	0,0002*
Dia 15	68 ± 38,6	38,9 ± 29,8	0,2078
Dia 30	34,1 ± 16,4	36 ± 26	0,8803
Dia 45	86,3 ± 43,3	38,3 ± 20,7	0,0626
Dia 60	37,8 ± 7,3	24,8 ± 17,1	0,3022
Dia 90	32,3 ± 11,1	45,7 ± 30	0,5009
Dia 120	45 ± 24,6	45,6 ± 42,1	0,9397
Dia 210	42,1 ± 23,4	39,2 ± 23,1	0,8521
Valor de P	<0.001	0.553	

Médias seguidas de letras diferentes apresentam significância estatística, minúscula na linha pelo teste t pareado e maiúscula na coluna pelo teste ANOVA, quando o valor de P < 0,05.

6.6.5 Determinação da PGE₂

Os dados referentes a concentração de PGE₂ no líquido sinovial encontram-se no apêndice L e L'.

Houve diferença estatisticamente significativa (p<0,05) nos valores de PGE₂ corrigida por uréia entre o grupo tratamento e controle nos dias 3 e 5, com o grupo tratamento apresentando maiores valores (Tabela 17).

Tabela 17 – Avaliações laboratoriais da concentração de PGE₂ corrigido por uréia (pg/mg de uréia), dos grupos tratado e controle, com valores das médias ± desvio padrão e valor de P
São Paulo – 2013-14

Cas Pauline - 2010-11

(Continua)

Variável	Tratamento	Controle	Valor de P
	Média ± DP	Média ± DP	
PGE ₂ por uréia			
Dia 0	110,9 ± 22,8	377,8 ± 384,2	0,468
Dia 3	540,6 ± 415,4	121,7 ± 24,1	0,0099*
Dia 5	1452 ± 1068,4	479,3 ± 483,1	0,0397*
Dia 7	1092,9 ± 503,8	674,2 ± 643,6	0,4083
Dia 15	969,5 ± 868,4	387 ± 344,2	0,1140
Dia 30	306,9 ± 165,5	261,6 ± 271,1	0,2967
Dia 45	564,4 ± 217,5	274,6 ± 182,4	0,0506
Dia 60	204,1 ± 96,8	117,7 ± 94,8	0,0733

Variável	Tratamento	Controle	(Conclusão) Valor de P
	Média ± DP	Média ± DP	
PGE₂ por uréia			
Dia 90	280 ± 253,2	352,4 ± 284,9	0,4465
Dia 120	426,9 ± 262,6	278,1 ± 194,8	0,0832
Dia 210	175,3 ± 60	298,7 ± 178,7	0,3131
Valor de P	<0,001	0,256	

Médias seguidas de letras diferentes apresentam significância estatística, minúscula na linha pelo teste t pareado e maiúscula na coluna pelo teste ANOVA, quando o valor de P < 0,05.

6.6.6 Determinação do TNF α e IL-1 β

Apesar da boa curva padrão, não foram encontrados valores detectáveis de TNF α e IL-1 β em ambos os grupos. Havia na placa, amostra de dois animais com artrite séptica, como controle positivo, porém também não apresentaram valores detectáveis.

Os dados referentes a leitura da placa de ELISA para TNF α e IL-1 β líquido sinovial encontram-se nos apêndices M e N, respectivamente.

6.6.7 Determinação de GAGs

Os dados referentes a concentração de condroitin sulfato no líquido sinovial encontram-se nos apêndices O e O'.

O sulfato de condroitina corrigido por uréia foi maior somente no dia 120 no grupo tratamento ($p < 0,05$) (Tabela 18). Nota-se, porém, ao comparar as médias, que o grupo controle apresentou aumento da concentração de sulfato de condroitina em 3 ($0,8 \pm 0,4$ mg/mg de uréia) e 5 ($0,3$ mg/mg de uréia) dias, os quais corresponderam ao dobro ($0,4 \pm 0,4$ mg/mg de uréia) e ao triplo ($0,1 \pm 0,1$ mg/mg de uréia) da média do grupo tratamento, respectivamente.

Tabela 18 - Avaliações laboratoriais da concentração de sulfato de condroitina corrigido por uréia (mg/mg de uréia), dos grupos tratado e controle, com valores das médias $\pm$ desvio padrão e valor de P – São Paulo – 2013-14

Variável	Tratamento	Controle	Valor de P
	Média ± DP	Média ± DP	
Sulfato de condroitina corrigido por uréia			
Dia 0	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,4972
Dia 3	0,4 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,2936
Dia 5	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,6007
Dia 7	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,5727
Dia 15	0,1 ± 0	0,1 ± 0,1	0,2908
Dia 30	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,8868
Dia 45	0 ± 0	0,1 ± 0	0,0635
Dia 60	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0	0,4042
Dia 90	0,1 ± 0	0,1 ± 0,1	0,3245
Dia 120	0,1 ± 0	0 ± 0	0,0320*
Dia 210	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,8101
Valor de P	0,003	<0,001	

Médias seguidas de letras diferentes apresentam significância estatística, minúscula na linha pelo teste t pareado e maiúscula na coluna pelo teste ANOVA, quando o valor de P < 0,05.

Os dados referentes a concentração de ácido hialurônico no líquido sinovial encontram-se nos apêndices P e P'.

Os valores de ácido hialurônico corrigido por uréia foram maiores no grupo controle, apresentando significância estatística ($p < 0,05$) nos dias 3, 45 e 90 (Tabela 19). Observou-se que o grupo controle apresentou média maior entre 3 e 45 dias, e que o grupo tratamento apresentou média maior em 60, 120 e 210 dias.

Tabela 19 – Avaliações laboratoriais da concentração de ácido hialurônico corrigido por uréia (mg/mg de uréia), dos grupos tratado e controle, com valores das médias $\pm$ desvio padrão e valor de P – São Paulo – 2013-14.

			(Continua)
Variável	Tratamento	Controle	Valor de P
	Média ± DP	Média ± DP	
Ácido Hialurônico corrigido por uréia			
Dia 0	1,2 ± 0,5	1,3 ± 0,6	0,0552
Dia 3	0,3 ± 0,1	1,9 ± 1,1	0,0047*
Dia 5	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,6	0,238
Dia 7	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,4	0,7516
Dia 15	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,2157

Variável	(Conclusão)		Valor de P
	Tratamento	Controle	
	Média ± DP	Média ± DP	
Ácido Hialurônico corrigido por uréia			
Dia 30	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,8	0,1708
Dia 45	0,5 ± 0,1	1 ± 0,3	0,0406*
Dia 60	0,9 ± 0,6	0,8 ± 0,2	0,7146
Dia 90	1,3 ± 0,5	1,8 ± 0,6	0,0292*
Dia 120	1,5 ± 0,5	1,4 ± 0,2	0,6712
Dia 210	1,4 ± 0,7	1,2 ± 0,3	0,9858
Valor de P	<0,001	<0,001	

Médias seguidas de letras diferentes apresentam significância estatística, minúscula na linha pelo teste t pareado e maiúscula na coluna pelo teste ANOVA, quando o valor de P < 0,05.

6.7 AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS

Nas avaliações macroscópicas segundo escore ICRS não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) (Tabela 20).

Ao verificar as médias e medianas nota-se que o grupo tratamento apresenta escore maiores para os critérios grau de reparo em relação ao nível da cartilagem ao redor e avaliação global do reparo em relação ao grupo controle. Logo, o grau de reparo mostra-se melhor (Grau 2) no grupo tratamento em relação ao grupo controle (Grau 3) (Figura 8).

Tabela 20 – Escores ICRS das avaliações macroscópicas do reparo de cartilagem dos grupos tratado e controle, atribuídos as variáveis no dia 210, com valores das médias ± desvio padrão, mediana e valor de P – São Paulo – 2013-14

Variável	Tratamento		Controle		Valor de P
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Grau de reparo em relação ao nível da cartilagem ao redor	3,4 ± 0,39	3	2,4 ± 0,39	2	0,084
Integração na zona de borda	2,4 ± 0,5	2	1 ± 0	1	0,059
Aparência macroscópica	2,4 ± 1,1	2	1,5 ± 0,6	2	0,371
Avaliação global do reparo	8,2 ± 1,9	8	4,8 ± 0,5	5	0,059
Grau	2,4 ± 0,5	2	3 ± 0	3	0,181

Medianas seguidas de letras diferentes apresentam significância estatística, minúscula na linha pelo teste de Wilcoxon e maiúscula na coluna pelo teste de Friedman, quando o valor de P < 0,05.

Escore: Grau de reparo em relação ao nível da cartilagem ao redor (0 – 4); Integração na zona de borda (0 – 4); Aparência macroscópica (0 – 4); Avaliação global do reparo (1 – 12); Grau (1 – 4).

Figura 8 - Imagens artroscópicas obtidas aos 210 dias do animal A2, onde A compõe o grupo tratamento e B o grupo controle– São Paulo – 2013-14

Fonte: (CARVALHO, 2013-14).

Legenda: Nota-se em **A** que o preenchimento do tecido de reparo obtido está semelhante à cartilagem ao redor, ao qual foi atribuído grau 2. Já em **B**, foi observado preenchimento parcial do leito do defeito criado e nota-se exposição do osso subcondral (seta), ao qual foi atribuído grau 3.

7 DISCUSSÃO

Os defeitos de cartilagem e a osteoartrite são frequentes doenças articulares, caracterizadas pela destruição da cartilagem articular, e consequentemente na perda da função articular. As estratégias atuais de tratamento são inadequadas : não resultam em restauração total da cartilagem hialina, e, portanto trazem um prognóstico incerto em longo prazo (ZHU et al., 2013). Incluídas nas estratégias de reparo cirúrgico da cartilagem estão a condroplastia e as microfraturas, que apesar de contribuírem para melhora clínica dos pacientes, obtém fibrocartilagem, a qual possui baixa resistência mecânica, levando a falha e desenvolvimento da osteoartrite. Neste sentido têm sido investigadas estratégias que utilizam engenharia tecidual de cartilagem com uso de células da própria cartilagem ou células tronco mesenquimais (ZHU et al., 2013).

Segundo Fortier e Travis (2011), para uso clínico em cães e cavalos, 3 abordagens de tratamento baseadas em células mesenquimais tem sido atualmente usadas para lesões de tendões, ligamentos e cartilagem articular. O primeiro método utiliza expansão em cultura de células oriundas de aspirado medula óssea; a segunda abordagem se baseia na utilização de aspirado concentrado misto de células oriundas de medula óssea e o terceiro método emprega uma mistura de células nucleadas oriundas de tecido adiposo. Cada técnica possui vantagens e desvantagens.

Células tronco mesenquimais adultas derivadas de medula óssea são capazes de dividir e diferenciar em diversos fenótipos celulares como osteoblasto, condrócito e adipócito. Secretam uma grande variedade de citocinas e fatores de crescimento, ambos possuem atividades autócrinas e parácrinas. Estes fatores suprimem o sistema imune local, inibem a fibrose e apoptose, aumentam a angiogênese e estimulam a mitose e diferenciação tecidual intrínseca. Estes efeitos, os quais são referidos como tróficos, são distintos de uma diferenciação direta da célula tronco mesenquimal injetada dentro do tecido de reparo (CAPLAN et al., 2006).

Mokbel et al. (2011) realizaram estudo investigando a atração celular e o efeito reparativo de células tronco de medula óssea injetadas em modelo de

osteoartrite induzida na articulação radiocárpica de mulas e confirmaram que há a incorporação das células marcadas injetadas sobre a nova cartilagem formada.

As técnicas que utilizam aspirado concentrado de medula óssea foram desenvolvidas no intuito de aumentar a concentração de células tronco em um reduzido tempo entre o diagnóstico e o tratamento de uma lesão (FORTIER et al., 2010). Neste sentido, quatro protocolos de isolamento de células mesenquimais oriundas de medula óssea têm sido investigados. O primeiro se baseia na capacidade de aderência plástica das células mesenquimais, e utiliza placas plásticas de cultivo, obtendo o isolamento em 5 dias (FORTIER et al., 1998; ARNHOLD et al., 2007). Os outros dois métodos se baseiam no gradiente de concentração e centrifugação, os quais separam as células em diferentes frações que são: hemácias, granulócitos, plaquetas e precursoras imaturas mielóides e células tronco mesenquimais (MSC). As MSC são encontradas em uma concentração que corresponde de 0,01 a 0,001 % do aspirado de medula óssea (TAYLOR; CLEGG, 2011). A solução de Ficoll (solução de polissacarídeo, densidade 1.077) tem sido frequentemente utilizada para isolamento de células mesenquimais oriundas de medula óssea (SMITH et al., 2003; PACINI et al., 2007; MOKBEL et al., 2011), bem como, a solução Percoll (Solução colóide com partículas de sílica, densidade 1.084 – 1.088) (COLLEONI et al., 2009). O quarto protocolo de obtenção utiliza um método automático e fechado de centrifugação do aspirado de medula óssea para obtenção de concentrado de medula óssea (FORTIER et al., 2010). De maneira semelhante ao obtido por Bourzac et al. (2010), o nosso protocolo para concentração de medula óssea obteve uma recuperação média de células mononucleares igual a $67,20 \times 10^6$ com viabilidade média em azul de tripan 0,2 % de 98,14%. Apesar de não ser a metodologia que mais concentra células mononucleares, é fácil e rápida de ser executada com estrutura laboratorial e de recursos humanos mínimos, ou seja, o próprio cirurgião familiarizado com a técnica pode fazer.

Fortier et al. (2010), utilizando método de centrifugação em sistema fechado para obtenção da concentração da medula óssea, realizou estudo comparando os resultados do tratamento com aspirado concentrado de medula óssea sobre o reparo de defeitos condrais totais contra o tratamento apenas com microfratura em modelo equino e concluiu que o tratamento proposto foi superior na melhora da qualidade de reparo de lesões agudas de cartilagem. Várias são as vantagens do

método utilizado neste trabalho, porém, ao avaliar a concentração de plaquetas obtidas nota-se a obtenção de 208300 ± 192400 plaquetas por microlitro, o que fica abaixo dos valores mínimos que tem sido proposto para exacerbar seus efeitos biológicos benéficos, que seria de 300000 plaquetas por microlitro ou 2 a 5 vezes o volume circulante (ANITUA et al., 2004; SMITH et al., 2006, YAMADA et al., 2012). Em nosso experimento foi utilizado o método manual com duas centrifugações de baixa rotação e a média obtida foi de 590667 plaquetas/ μ l o que foi superior a média obtida por Carmona e Lopez (2011), Yamada et al. (2012) e Carmona (2013), os quais obtiveram melhora dos quadros clínicos nos animais com concentrações entre 300 a 450.000 plaquetas/ μ l.

As plaquetas participam ativamente do processo de reparo por fornecer uma grande quantidade de fatores de crescimento e outras moléculas bioativas (quimocinas, metabólitos do ácido aracdônico, matriz extracelular, nucleotídeo, ácido ascórbico) para o local da lesão, por meio da exocitose seguida da aderência ou estimulação pela trombina ativada pela via do cálcio. Dentre os vários fatores de crescimento secretados pelas plaquetas destacam-se o fator de crescimento ligado a insulina (IGF-1) e o TGF- β , os quais promovem um provado efeito anabólico *in vitro*, aumentando a produção de matriz, proliferação celular e diferenciação osteocondrogênica (PIETRZAK et al., 2005, RE'EM et al., 2012).

O TGF- β diminui a expressão genética do colágeno tipo 1 e simultaneamente aumenta a expressão do gene do colágeno tipo 2 bem como do agregan. Cooperar com bFGF para induzir a suplementação e migração de células estromais da medula óssea para o local da lesão. Concomitantemente, estimula o “Homing”, proliferação e diferenciação condrogênica das células estimuladas (RE'EM et al., 2012). Em nosso experimento utilizamos os efeitos aditivos do aspirado concentrado de medula óssea ao plasma rico em plaquetas, acrescidos de ácido hialurônico exógeno para alcançar uma melhor qualidade do tecido de reparo obtido pela técnica de microfraturas do osso subcondral.

A viscosuplementação com ácido hialurônico é utilizada comumente como tratamento de suporte em doenças articulares em humanos e equinos. Entre diversos efeitos deste composto destaca-se o aumento da viscosidade do líquido sinovial, diminuição da dor e melhora da função articular. De maneira interessante, Hegewalt et al. (2004) realizaram estudo *in vitro* e concluíram que a utilização de ácido hialurônico e líquido sinovial induz a diferenciação condrogênica de células

tronco de medula óssea de equinos, o que corrobora com o presente estudo que utiliza o ácido hialurônico como aditivo ao tratamento proposto.

Com intuito de investigar os efeitos do tratamento proposto sobre as articulações metacarpofalangeana em estudo foi feito um protocolo de avaliação que inclui exame físico dos animais, estudo por imagem, avaliação bioquímica e física do líquido sinovial e avaliação macroscópica do tecido de reparo formado.

Ao avaliar as variáveis de exame físico não houve diferença estatística entre o grupo tratado e controle, no entanto notou-se diferença estatística ($p < 0.05$) quando foi feita avaliação entre os momentos do grupo tratamento, no qual as medianas mostraram presença de claudicação, dor a movimentação passiva, diminuição da mobilidade articular e aumento do volume articular entre 15 e 45 dias de pós-operatório. Acreditamos que as alterações notadas neste grupo, nestes momentos, se devem ao fato de ter ocorrido uma resposta inflamatória articular em resposta a injeção do tratamento proposto em 0, 15 e 30 dias. A resposta mais intensa de dor foi notada até 30 dias e acreditamos que possa ser atribuída a adição do aspirado concentrado de medula óssea, pois Moraes (2013) em seu estudo, fez aplicação PRP em articulações metacarpofangeanas de equinos normais e não verificou presença de claudicação. Já Yamada (2012), ao realizar estudo sobre o efeito da administração seriada de PRP em lesões condrais induzidas e tratadas com microfraturas, verificou situação semelhante a encontrada em nosso experimento, pois o grupo tratamento apresentou um baixo grau de claudicação até 60 dias de pós-operatório e ausência de claudicação após 90 dias até o término do período experimental com 150 dias. McIlwraith et al. (2011) ao investigar se a administração intra-articular de ácido hialurônico e células tronco mesenquimais cultivadas aumentava o reparo de defeitos condrais experimentalmente criados e tratados com microfraturas, verificou também que nos equinos onde foi administrado o tratamento proposto houve dor e claudicação leve em comparação ao grupo controle, porém, este efeito também foi transitório. Contudo, ao avaliar os trabalhos citados acima é possível concluir que há presença de claudicação leve a moderada, porém, é transitório, assim como encontrado em nosso trabalho ($p < 0,021$), e não trás prejuízos aos parâmetros físicos articulares avaliados após os 90 dias.

De maneira semelhante aos estudos realizados por Martins (2010); McIlwraith et al. (2011); Moraes (2013) e Silva (2014) fizemos o estudo dos efeitos

do tratamento proposto com o uso de exame radiográfico e ultrassonográfico das articulações metacarpofalangeana.

Martins (2010) ao realizar exame radiográfico para estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana através da aplicação sobre defeito experimentalmente criado na articulação tibiotársica de equinos, verificou a presença de enteseófitos e osteófitos em ambos os grupos, porém, com maior frequência no grupo tratado. Verificou ainda que de nove critérios avaliados somente três apresentaram alterações durante o período experimental: aumento de volume dos tecidos moles, evidência de osteófitos e evidência de enteseófitos. McIlWraith et al. (2011b) em seu estudo também utilizou exame radiográfico para avaliar os efeitos do tratamento com células tronco mesenquimais cultivadas sobre reparo de lesões condrais induzidas na tróclea do fêmur e tratadas com microfraturas e ácido hialurônico e verificou presença de proliferação óssea, lise, formação de osteófitos e opacidade do defeito, porém, em graus leves, e conclui que apesar das variações nos achados radiográficos não houve diferença estatística entre os grupos. Estes dados corroboram com o presente trabalho que verificou a presença de enteseófito no grupo tratado com aumento significativo ($p=0,047$) entre os momentos que se seguiam, porém, sem haver diferença estatística entre os grupos. Contudo, acreditamos, assim como Martins (2010), que a presença dos achados radiográficos encontrados se devam ao trauma cirúrgico e não à resposta à administração de concentrado de medula óssea com PRP.

As características radiográficas da osteoartrite não se correlacionam com os sintomas a nível individual do paciente, o que acarreta em valor limitado da radiografia convencional no contexto clínico. Por estas razões, novas técnicas de imagens têm sido testadas e utilizadas como auxílio à radiografia convencional na investigação e manejo da osteoartrite no contexto clínico e em estudos de investigação. A ultrassonografia surge como uma alternativa para estas situações (KEEN; CONAGHAN, 2009). No entanto, a ultrassonografia tem duas limitações principais em examinar articulações. A primeira relaciona o fato de que não é possível examinar toda a articulação do paciente, pois existe uma limitação da janela acústica. Segundo, a técnica da ultrassonografia não permite avaliar alterações ósseas intrínsecas (KEEN; CONAGHAN, 2009). Com exame ultrassonográfico é possível avaliar a sinóvia, o líquido sinovial, o córtex ósseo, cartilagem, tendões e ligamentos (KEEN; CONAGHAN, 2009). De maneira complementar, Denoix et al.

(1996) concluiu em seu estudo que a ultrassonografia é uma técnica muito útil para identificar e descrever estes tecidos moles no aspecto dorsal e abaxial da articulação metacarpofalangeana.

Moraes (2013), em seu experimento com injeção de PRP na articulação metacarpofalangeana, utilizou a ultrassonografia como método adicional de avaliação dos efeitos da administração do tratamento proposto e verificou que nas articulações do grupo tratamento houve aumento de volume do líquido sinovial entre 14 e 28 dias. Martins (2010) também verificou aumento da quantidade de líquido sinovial, porém, em ambos os grupos tratamento e controle e ao final de 180 dias de pós-operatório notou uma tendência à redução do conteúdo anecóico no recesso medial da articulação tibiotársica. Este autor acredita que a redução ocorreu não somente pela redução na produção do líquido sinovial mais também pelo aumento das membranas sinoviais. Em nosso experimento não houve diferença estatística entre os grupos, porém, na avaliação entre os momentos 15 a 45 dias do grupo tratamento houve aumento na quantidade de líquido sinovial até metade do volume fisiológico ($p=0,022$). Notou-se uma média ligeiramente maior aos 15 dias e uma média levemente mais baixa que se manteve em 30 e 45 dias. Isto possivelmente ocorreu devido a uma resposta inflamatória maior a injeção do aspirado concentrado de medula óssea. Esta hipótese foi sustentada pela avaliação da PGE_2 , proteína e células nucleadas totais no líquido sinovial conjuntamente com a avaliação física dos animais os quais também apresentaram maiores medianas de escores neste mesmo período. No entanto, este critério de avaliação ultrassonográfico se igualou ao momento zero em 90 dias de pós-operatório até o termino do período experimental.

Três quesitos foram utilizados para avaliar ultrassonograficamente a cápsula articular que foram: espessura, inserção e aspecto. Não houve diferença estatística entre o grupo tratado e controle, porém houve diferença estatística ao comparar os momentos do grupo tratado para os três quesitos ($p<0,05$). Apesar de não ter sido verificada diferença estatística entre os grupos, ao avaliar as medianas nota-se um espessamento da cápsula articular maior no grupo tratado do que no grupo controle até 90 dias, porém, ambos apresentaram aumento da espessura da cápsula articular e se igualaram em escore 1 até o final do período experimental. Portanto, há um espessamento da cápsula articular em resposta ao trauma cirúrgico, no entanto a regressão é sutilmente mais rápida nas articulação que não receberam o tratamento proposto. No quesito inserção e aspecto as alterações ocorreram de forma similar ao

questo discutido acima, porém, em ambos a comparação entre os momentos também apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) e o aspecto da cápsula articular de ambos os grupos regrediram para mediana de escore zero.

Foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os dias das variáveis superfície articular e presença de osteófitos do osso subcondral. Apesar de não haver diferença estatística, notou-se uma leve precocidade na tendência de melhora do escore superfície articular no grupo tratamento, porém, ao término do período experimental os grupos se igualaram e não foi mais possível obter diferença entre os grupos. Sabe-se que há formação de tecido de reparo sobre o leito de um defeito condral tratado com microfraturas (FRISBIE et al., 1999), porém, o que se observou no presente experimento com uso da ultrassonografia foi uma regressão ligeiramente mais rápida do escore superfície articular no grupo tratado em comparação ao grupo controle, e acreditamos que isso possa ser atribuído a expectativa de anabolismo gerado pela somatória dos efeitos do tratamento proposto. Fato este reforçado pela menor concentração de condroitin sulfato no líquido sinovial nos dias 3 e 5 no grupo tratado.

Quanto a presença de osteófitos, apesar de ter havido diferença estatística apenas no grupo tratamento, a mediana dos dois grupos é igual o que sugere que, assim como discutido nos achados radiográficos, possa ser uma reação tardia ao trauma cirúrgico e não à resposta a administração articular de concentrado de medula óssea e PRP.

Na avaliação laboratorial das variáveis cor, viscosidade e aspecto do líquido sinovial não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Entretanto, comparar as medianas da variável cor entre os grupos nota-se que há uma tendência a alteração da cor devido a cirurgia até 7 dias, pois o grupo controle regride a mediana do tempo zero. Já no grupo tratamento nota-se um retardo maior em relação ao grupo controle, pois o retorno da mediana ao basal ocorreu apenas em 120 dias. A maioria dos trabalhos não tem utilizado a avaliação física do líquido sinovial. Moraes (2013) em seu estudo com injeção de PRP em articulações hígidas não verificou diferenças na cor do líquido sinovial entre os grupos e nem entre os momentos, ou seja, não houve efeito do tratamento do PRP sobre esta variável. Os achados encontrados no presente estudo se assemelham muito aos achados de Martins (2010). Nota-se uma possível correlação entre os achados de cor e aspecto com proteína e celularidade do líquido sinovial, sendo as alterações mais

acentuadas entre 3 e 60 dias, porém, retornam a níveis semelhantes aos basais. Contudo atribuímos ao concentrado de medula óssea o efeito de piora nas variáveis cor, aspecto, celularidade e proteína.

Na avaliação da viscosidade do líquido sinovial, apesar de não haver significância estatística, nota-se que 3 dias após a cirurgia houve perda da viscosidade do líquido sinovial do grupo tratado, e isso ocorreu de forma mais acentuada do que no grupo controle, a despeito do tratamento realizado com ácido hialurônico. Acreditamos que a resposta inflamatória ocorrida no grupo tratamento possa ter prejudicado a viscosidade. Concomitantemente, houve grande aumento da contagem total de células nucleadas bem como de proteínas ($p=0,0055$) e PGE_2 ($p=0,0099$), ambas corrigidas por uréia. Ainda avaliando a dinâmica da viscosidade do líquido sinovial, notamos que no dia 5, 7 e 15 houve uma progressiva piora em ambos os grupos até ocorrer ausência de viscosidade (escore 4). Neste momento (M15) houve uma nova injeção articular em ambos os grupos e a viscosidade progressivamente foi melhorando culminando no retorno ao nível basal ao término do período experimental em ambos os grupos.

Os valores de proteína no líquido sinovial são normalmente menores que 2,5 g/dL (CURTISS, 1964). No presente trabalho houve aumento estatisticamente significativo em 3, 5 e 7 dias de pós-operatório no grupo tratamento. Dentre possíveis causas incluem-se o trauma em cirurgias articulares (KAWCAK et al., 1997; ROSSETTI et al., 2012), alterações inflamatórias gerado pela infiltração de células tronco mesenquimais e PRP (PIGOTT et al., 2013; MORAES, 2013) e a possibilidade de alta concentração de proteínas no tratamento administrado (MOREIRA et al., 2014)¹. Apesar de todas estas hipóteses, há maior probabilidade de ter ocorrido uma maior resposta inflamatória a células mononucleares do aspirado concentrado de medula óssea injetadas no momento zero, pois ao avaliar o momento 15 e 30 dias, onde houve nova administração de PRP, não ocorreu aumento de proteína. Exclui-se também o efeito do trauma cirúrgico, pois o grupo controle apresentou concentração, estatisticamente significativa, mais baixa do que o grupo tratamento. Contudo, podemos atribuir o aumento da proteína como

¹ MOREIRA, J. J.; MORAES, A. P.; BROSSI, P. M.; MACHADO, T. S.; MICHELACCI, Y. M.; MASSOCO, C. O.; BACCARIN, R. Y. Autologous processed plasma: cytokine profile and effects upon injection in healthy equine joint. **Journal of Veterinary Science**, sep. 30, 2014.

resposta inflamatória a injeção de aspirado concentrado de medula óssea, porém esse efeito é transitório, pois ao final do período experimental a proteína estava próxima ao nível basal e dentro dos limites fisiológicos.

A hipótese do aumento de proteína ser devido ao processo inflamatório é ainda mais sustentada pela avaliação da concentração de PGE_2 , o qual apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) nos dias 3 e 5. As prostaglandinas são produzidas por condrócitos e sinoviócitos em altas concentrações nas articulações inflamadas (ROSS et al., 2012). A ação inflamatória da PGE_2 na articulação inclui vasodilatação, aumento da percepção neurogênica, aumento da degradação da cartilagem, desmineralização óssea e promoção de ativadores de PA (CARON, 2011).

Conforme realizado por Brossi (2014), para caracterizar eventos relacionados ao metabolismo da matriz extracelular e à homeostase articular, foram realizadas dosagens de dois GAGs, o CS e o AH, no líquido sinovial. A importância destes GAGs para o perfeito funcionamento articular justifica sua identificação e quantificação. Neste sentido, deve-se utilizar métodos apropriados, e o método aqui empregado mostrou ser simples, confiável e superior a outros testes comumente relatados como o azul de dimetilmetileno (DMMB) e o de detecção de epítomos de agregam (MACHADO et al., 2012).

Machado et al. (2012) ao realizar estudo em busca de métodos para avaliar a condição articular em animais assintomáticos com OCD e outras doenças articulares em equinos observou aumento da concentração de condroitim sulfato (CS) em animais portadores de OCD e assintomáticos. Brossi (2014) em seus estudos atribuiu o aumento de CS no líquido sinovial a degradação da matriz extracelular.

Em nosso experimento, os maiores valores médios da concentração do CS ocorreu no grupo controle em 3 e 5 dias, o que poderia sugerir que houve uma inibição da degradação de matriz extracelular da cartilagem no grupo tratado. No entanto, não houve diferença estatística neste achado.

Na avaliação da concentração de ácido hialurônico (AH) no líquido sinovial foi possível observar que havia elevação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em 3, 45 e 90 dias no grupo controle. Estudos sugerem que o aumento da concentração de AH pode ser atribuído a destruição de cartilagem articular em humanos com trauma articular agudo (ASARI et al., 1994) e em equinos com osteocondrite (BROSSI, 2014). Estes autores correlacionam ainda, concomitantemente, o aumento de condroitim sulfato. Com base nestas conclusões, podemos formular hipótese que o

tratamento aqui realizado pode ter agido por duas vias, diminuindo a degradação da matriz extracelular e promovendo anabolismo no reparo da lesão de cartilagem criada experimentalmente. Estas hipóteses poderão ser provadas com a continuação deste estudo através de avaliação comparativa histológica do tecido de reparo formado entre o grupo tratado e controle. A avaliação macroscópica indica que possivelmente o grupo tratamento apresentará melhor escore histológico, pois esse apresentou melhor escore macroscópico ICRS do tecido de reparo.

Para avaliação do aspecto macroscópico do tecido de reparo formado foi utilizado o escore criado pela sociedade internacional de reparo de cartilagem (ICRS) conforme Borne et al. (2007); Enea et al. (2015) e Borne et al. (2007) realizou estudo comparando 2 sistemas de escore para avaliar lesões tratadas com microfraturas e condrocito autólogo em humanos, o escore macroscópico ICRS e o escore artroscópico Oswestry (OAS) e concluiu que ambos são validados para avaliação de reparo de cartilagem. Em nosso estudo, para avaliação do aspecto macroscópico do tecido de reparo formado, foi utilizado o escore criado pela sociedade internacional de para reparo de cartilagem (ICRS) conforme Brittberg e Minalski (2003); Fortier et al. (2010) e Enea et al. (2015). Este escore utiliza a avaliação artroscópica baseada em 3 critérios: o grau do defeito preenchido por tecido de reparo, a integração de borda entre o tecido de reparo e a cartilagem normal adjacente e a aparência macroscópica da superfície do tecido de reparo. Para cada um destes critérios subjetivos de avaliação artroscópica foi atribuído um escore máximo igual a 4, ou seja, 4 pontos. O reparo é classificado com base no somatório dos pontos em grau 1 (12 pontos), grau 2 (8 a 11 pontos), grau 3 (4 a 7 pontos) ou grau 4 (0 a 3 pontos), ou seja, normal, quase normal, anormal e gravemente anormal, respectivamente (BRITTBERG; MINALSKI, 2003).

Em nosso experimento a mediana da somatória dos escores foi igual a 8 no grupo tratamento e 5 no grupo controle, ou seja, grau 2 (quase normal) para grupo tratamento e grau 3 (anormal) para grupo controle. Destaque deve ser dado para os critérios grau preenchimento do defeito e integração de borda, os quais foram acentuadamente melhores no grupo tratamento, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística. Acreditamos que o efeito anabólico ocorreu devido ao sinergismo entre o aspirado concentrado de medula óssea, plasma rico em plaqueta e ácido hialurônico sobre as microfraturas realizadas no defeito condral total criado experimentalmente.

8 CONCLUSÃO

A administração intra-articular de concentrado de medula óssea e plasma rico em plaquetas sobre lesões condrais induzidas e tratadas com microfraturas e ácido hialurônico produziu uma reação articular transitória, principalmente nos primeiros 60 dias, e foi evidenciado pelo aumento de PGE_2 e proteínas no líquido sinovial, bem como, claudicação, dor a flexão passiva, diminuição da mobilidade articular e aumento de volume articular. No entanto, produziu um efeito condroprotetor e anabólico sobre tecido de reparo formado, uma vez que o grupo tratado apresentou menor concentração de ácido hialurônico 3, 45 e 90 dias no líquido sinovial e melhor escore macroscópico ICRS aos 210 dias.

REFERÊNCIAS

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

ABELLANET, I.; PRADES, M. Intraarticular platelet rich plasma (PRP) therapy: Evaluation in 42 sport horses with OA. In: PROCEEDINGS OF THE 11TH INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 2009, Guarujá. **Anais...** Guarujá: World Equine Veterinary Association, 2009.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A.T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostais**, v. 91, n.1, p. 4-15, 2004.

ARNHOLD, S. J.; GOLETS, I.; KLEIN, H.; STUMPF, G.; BELUCHE, G.; ROSDE, C.; ADDICKS, K.; LITZKE, L. F. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells, **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 1095 – 1105, 2007.

BAXTER, G. M. **Adams and Stashak's Lameness in horses**. 6. ed: Wiley-Blackwell, 2011, pp. 1535.

BERTONE, A. L. Distal Limb: Fetlock and Pastern. In: HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GOER, R. J. **Equine sports medicine and surgery**. Eds. Elsevier Science Ltd, 2004, p. 289–319.

BORNE, P. J.; RAJMAKERS, N. J. H. VANLAUWE, J.; VICTOR, J.; JONG, S. N.; BELLEMANS, J. International cartilage repair society and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in autologous chondrocyte implantation and microfracture. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, p. 1397 – 1402, 2007.

BOURZAK, C.; SMITH, L. C.; VINCENT, P.; BEAUCHAMP, G.; LAVOIE, J. P.; LAVERTH, S. Isolatoins of equine bone marrow-derived mesenchymal cells: A comparison between three protocols. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 46, p. 519-527, 2010.

BRANDT, K. D.; DIEPPE, P.; RADIN, E. L. Etiopathogenesis of osteoarthritis, **Rheumatic Disease Clinics Of North America**, v. 34, p. 531-559, 2008.

BRITTBERG, M.; WINALSKY, C. Evaluation of cartilage injuries and repair, **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85-A, 2003, Supplement 2.

BROMMER, H.; LAASANEN, M. S.; BRAMA, P. A. J.; WEEREN, P. R.; HELMINEN, H. J.; JURVELIN, J. S. Functional consequences of cartilage degeneration in the equine metacarpophalangeal joint: quantitative assessment of cartilage stiffness. **Equine Veterinary Journal**. v. 37, n.5, p. 462-467, 2005.

BROSSI, P. M. **Investigação laboratorial dos efeitos antioxidantes do plasma processado autólogo nas principais enfermidades articulares em equinos após tratamento artroscópico**. 2014. 286 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.98, n. 5, p. 1076–1084, 2006.

CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment for Shoulder Injury in a Horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.31, p. 506–510, 2011.

CARMONA, J. U; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I. J.; Autologous platelet concentrates as an adjunctive treatment for chronic laminitis in a mare with pituitary pars intermedia dysfunction. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 191–195, 2013.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. (2ª Ed.) **Diagnosis and Management of Lameness in the Horse**., St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders, 2011, pp 655 – 668.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor, **Veterinary Research Communication**, v. 33, p.811–821, 2009.

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

DEL BUE, M.; RICCO, S.; RAMONI, R.; CONTI, V.; GNUDI, G.; GROLLI, S. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. **Veterinary Research. Communication**, v. 32, p. 51-55, 2008. Supplement 1.

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. 1, n. 28, p. 54-62, 1996.

DESJARDINS, M. R.; HURTING, M. B.; PALMER, N. C. Incorporation of fresh and cryopreserved bone in osteochondral autografts in the horse. **Veterinary Surgery**, v. 20, n. 6, p. 446-452, 1991.

DUNKEL, B.; BOLT, D. M.; SMITH, R. K.; CUNNINGHAM, F. M. Stimulus-dependent release of tissue-regenerating factors by equine platelets. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 3, p. 346–354, 2012.

ENEA, D.; CECCONI, S.; CALCAGNO, S.; BUSILACCHI, A.; MANZOTTI, S.; GIGANTE, A. One-step cartilage repair in the knee: collagen-covered microfracture

and autologous bone marrow concentrate. A pilot study. **The Knee**, v. 22, p. 30–35, 2015.

EYRE, D. R. Collagens and cartilage matrix homeostasis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 427, p. 118-122, 2004.

FORTIER, L. A.; NIXON, A. J.; WILLIAMS, J.; CABLE, C. S. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells, **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 1182–1187, 1998.

FORTIER, L. A.; POTTER, H. G.; RICKEY, E. J.; SCHNABEL, L. V.; FOO, L. F.; CHONG, L. R.; STOKOL, T.; CHEETHAM, J.; NIXON, A. J. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. **The journal of bone and joint surgery**, v. 92-A, n. 10, p. 1927–1937, 2010.

FORTIER, L.A.; TRAVIS, A.J. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 2, n. 9, p. 1–6, 2011.

FRAZER, A.; BUNNING, R. A.; THAVARAJAH, M.; SEID, J. M.; RUSSELL, R. G. Studies on type II collagen and aggrecan production in human articular chondrocytes in vitro and effects of transforming growth factor-beta and interleukin-1beta. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 2, n. 4, p. 235–245, 1994.

FRISBIE, D. D.; GHIVIZZANI, S. C.; ROBBINS, P. D.; EVANS, C. H.; McILWRAITH, C. W. Treatment of experimental equine osteoarthritis by an in vivo delivery of the equine-1 receptor antagonist gene. **Gene Therapy**, v. 9, n. 1, p. 12-20, 2002.

FRISBIE, D. D.; TROTTER, G. W.; POWERS, B. E.; RODKEY, W. G.; STEADMAN, J. R.; HOWARD, R. D.; PARK, R. D.; McILWRAITH, C. W. Arthroscopy subcondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horse, **Veterinary Surgery**, v. 28, p. 242–255, 1999.

FRISBIE, D. D. Medical treatment of joint disease. In: AUER, J.A.; STICK, J.A. **Equine Surgery**. 4. ed. Elsevier-Saunders, St. Louis, Missouri, 2012. p. 1114-1122.

FRISBIE, D.D.; STEWART, M.C. Cell-based therapies for equine joint disease. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 27, p. 335-349, 2011.

GARVICAN, E. R.; VAUGHAN-THOMAS, A.; INNES, J. F.; CLEGG, P. D. Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of collagen degradation and synthesis. **The Veterinary Journal**, n. 185, p. 36–42, 2010.

GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in horse - A review, **Veterinary Journal**, v. 51, p. 51–69, 2006.

GRAUW, J. C.; BRAMA, P. A.; WIEMER, P.; BROMMER, H.; LEST, C. H. V.; WEEREN, R. V. Cartilage-derived biomarkers and lipid mediators of inflammation in

horses with osteochondritis dissecans of the distal intermediate ridge of the tibia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 7, p. 1156-1162, 2006.

HARRIS, J. D.; SISTON, R. A.; PAM, X.; FLANIGAN, D. C. Autologous chondrocyte implantation: systematic review. **Journal of bone and Joint surgery**, v. 92, n. 12, p. 2220-2233, 2010.

HAYES, D. W.; BROWER, R. L.; JOHN, K. J. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 18, p. 35-53, 2001.

HEGEWALT, A. A.; RINGE, J.; BARTEL, J.; KRUGER, I.; NOTTER, M.; BARNEWITZ, D.; KAPS, C.; SITTINGER, M. Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: preliminar study. **Tissue and cell**, v. 36, p. 431-438, 2004.

HUNTER, D. J. Osteoarthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 6, p. 801-814, 2011.

HUNZIKER E. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, p. 432–463, 2002.

HUNZIKER, E. B.; ROSENBERG, L. C. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 78-A, p. 721-733, 1996.

HUNZIKER, E.B.; LIPPUNER, K.; KEEL, M.J.B.; SHINTANI, N. An educational review of cartilage repair: precepts & practice e myths & misconceptions e progress & prospects. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 2, p. 1-17, 2015.

KATZENSTEIN, P. L.; MALEMUD, C. J.; PATHRIA, M. N.; CARTER, J. R.; SHEON, R. P.; MOSKOWITZ, R. W. Early onset primary osteoarthritis and mild chondrodysplasia: radiographic and pathologic studies with an analysis of cartilage proteoglycans. **Arthritis & Rheumatism**, v. 33, n. 5, p. 674-684, 1990.

KAWCAK, C.E.; FRISBIE, D.D.; TROTTER, G.W.; McILWRAITH, C.W.; GILLETTE, S.M.; POWERS, B.E.; WALTON, R.M. Effects of intravenous administration of sodium hyaluronate on carpal joints in exercising horses after arthroscopy surgery and osteochondral fragmentation, **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n.10, p. 1132, 1997.

KEEN, H. I.; CONAGHAN, P. G. Usefulness of ultrasound in osteoarthritis, **Rheumatic Disease Clinics North America**, v. 35, p. 503–519, 2009.

KESSLER, M.; ACKERMAN, G.; DINES, J. S.; GRANDE, D. Emerging Technologies and Fourth Generation Issues in Cartilage Repair. **Sports Medicine Arthroscopic Research**, v. 16, n. 4, p. 246-254, 2008.

KONG, E.; MANDELBAUM, B.; BUDA, R.; FILARDO, G.; DELCOGLIANO, M.; TIMONCINI, A.; FORNASARI, P. M.; GIANNINI, S.; MARCACCI, M. Platelet-rich

plasma intra-articular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatment for cartilage pathology: from early degeneration to osteoarthritis.

Arthroscopy: The journal of Arthroscopy and Related Surgery, v. 27, n. 11, p. 1490-1501, 2011.

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

MARTINS, E. A. N. **Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do talus de equinos**. 2010. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MATSUMOTO, T.; OKABE, T.; IKAWA, T.; TAKAHIRO, I.; YASUDA, H.; NAKAMURA, H.; WAKITANI, S. Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cells. **Journal of cell physiology**, v. 225, p. 291-295, 2010

MCILWRAITH, C. W. **Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse**. 3. ed. Philadelphia: Mosby-Elsevier, 2005a, p. 479.

MCILWRAITH, C. W. From arthroscopy to gene therapy – 30 years of looking in joints. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS ANNUAL CONVENTION, 51., 2005b, Colorado. **Anais...** Colorado: AAEP, 2005b.

McILWRAITH, C. W. Joint injuries and disease and osteoarthritis. In: BAXTER, G. M. **Adams and Stashak lameness in horses**, West Sussex: Blackwell Publishing, 2011a. Cap. 7, p. 998–1027.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E. Current treatment for traumatic synovitis, capsulitis and osteoarthritis. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 47., 2001, Lexington, **Proceedings...** Lexington: [s.n], 2001.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; RODKLEY, W. G.; KISIDAY, J. D.; WERP, N. M.; KAWCAK, C. E.; STEADMAN, J. R. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 27, n. 11, p. 1552-1561, 2011b.

MCNICKLE, A. G.; PROVENCHER, M. T.; COLE, B. J. Overview of existing cartilage repair technology. **Sports Medicine Arthroscopy**, n. 16, p. 196-201, 2008.

MILANO, G.; DERIU, L.; PASSINO, E. S.; MASALA, G.; MANUNTA, A.; POSTACCHINI, R.; SACCOMANNO, M. F.; FABBRICIANI, C. Repeated platelet concentrate injection enhance reparative responses of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: An experimental study in a animal model. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 28, n. 5, p. 688-701, 2012.

MOKBEL, A. N.; TOOKHY, O. S. E.; SHAMAA, A. A.; RASHED, L. A.; SABRY, D.; SAYED, A. M. E. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 12, p. 259, 2011.

MORAES, A. P. L. **Resposta ao uso intra-articular do plasma rico em plaquetas em equinos hígidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos**. 2013. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MOREIRA, J. J. **Avaliação dos efeitos da utilização de plasma autólogo condicionado em articulações sinoviais de equinos**. 2013. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MOSNA, F.; SENSEBE, L.; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cell: a user's guide. **Stem Cells**, v. 19, n. 10, p. 1449-1470, 2010.

NIXON, A. J. Arthoscopic techniques for cartilage repair. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 1, n. 4, p. 257-269, 2002.

O'KEEFE, R. J.; CRABB, I. D.; PUZAS, J. E.; ROSIER, R. N. Effects of transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factor on knee surgery sports traumatology arthroscopic DNA synthesis in growth plate chondrocytes are enhanced by insulin-like growth factor-I. **Journal Orthopedic Research**, v. 12, n. 3, p. 299-310, 1994.

PACINI, S.; SPINABELLA, S.; TROMBI, L.; FAZZI, R.; GALIMBERTI, S.; DINI, S.; CARLUCCI, F.; PETRINI, M. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses, **Tissue Engineering**, v. 13, p. 2449-2955, 2007.

PEARCE, S. G.; HURTING, M. B.; BOURE, L. P.; RADCLIFFE, R. M.; RICHARDSON, D. W. Cylindrical press-fit osteocondral allografts for resurfacing the equine metatarsophalangeal joint. **Veterinary Surgery**, v. 32, n. 3, p. 220-230, 2003.

PIETRZAK, W. S.; EPPLEY, B. L. Platelet rich plasma: biology and new technology, **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, p. 1043-1054, 2005.

PIGOTT, J. H.; ISHIHARA, A.; WELLMAN, M. L.; RUSSELL, D. S.; BERTONE, A. L. Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. **Veterinary Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 26, p. 453-460, 2013.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.

POOL, R. R. Pathologic manifestations of joint disease in the athletic horse. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, W. B. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders Co., 1996. p. 87-104.

PUJOL, J. P.; CHADJICHRISTOS, C.; LEGENDRE, F.; BAUGÉ, C.; ANDRIAMANALIJAONA, R.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K. Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. **Connect Tissue Research**, v. 49, n. 3, p. 293–297, 2008.

RE'EM, T.; KAMINER-ISRAELI, Y.; RUNINOV, E.; COHEN, S. Chondrogenesis of hMSC in affinity-bound TGF-beta scaffolds. **Biomaterials**, v. 33, p. 751–61, 2012.

ROSS, T. N.; KISIDAY, J. D.; HESS, T.; McILWRAITH, C. W. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 12, p. 1583–1590, 2012.

ROSSETTI, R. B.; MASSOCO, C. D. O.; PENNA, A. C. A.; SILVA, L. C. L. C. Na experimental study to compare inflammatory response due to liquid or gas joint distention in horses submitted to arthroscopy. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 12, p. 848–854, 2012.

SCHMIDT, M. B.; CHEN, E. H.; LYNCH, S. E. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 14, n. 5, p. 403–412, 2006.

SMITH, R. K.; KORDA, M.; BLUNN, G. W.; GOODSHIP, A. E. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as potential novel treatment, **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 99 -102, 2003.

SMITH, J. J.; ROSS, M. W.; SMITH, R. K. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts *in vitro*. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and. Traumatology**, v. 19, p. 43-47, 2006.

STEWART, M.; STEWART, A. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, n. 27, p. 243-261, 2011.

TAYLOR, S. E.; CLEGG, P. D. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 27, p. 263-274, 2011.

TEXTOR, J. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: Platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, n. 27, p. 275-298, 2011.

TODHUNTER, R. J. Anatomy and physiology of synovial joint. In: MCILWRAITH, C. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia, PA, USA: W.B. Saunders Co., 1996. p. 1-28.

TODHUNTER, R. J.; LUST, G. Synovial joint anatomy, biology and pathobiology. In: AUER, J. A. **Equine surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1992. p. 844-866.

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

ULRICH-VINTHER, M.; MALONEY, M. D.; SCHWARZ, E. M.; ROSIER, R.; O'KEEFE, R. J. Articular cartilage biology. **Journal American Academy of Orthopedic Surgery**, v. 11, p. 421–430, 2003.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v. 36, p. 613-622, 2007.

VIOLINI, S.; RAMELLI, P.; PISANI, L. F.; GORNI, C.; MARIANI, P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. **BMC Cell Biology**, v. 29, n. 10, p. 1-10, 2009.

WAKITANI, S.; IMOTO, K.; YAMOTO, T.; YONEDA, M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritis knees. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 3, p. 199-206, 2002.

YAMADA, A. L. M.; CARVALHO, A. M.; OLIVEIRA, P. G. G.; FELISBINO, S. L.; QUEIROZ, D. L.; WATANABE, M. J.; HUSSNI, C. A.; ALVES, A. L. G. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 323–332, 2012.

ZHU, Y.; YUAN, M.; MENG, H. Y.; WANG, A. Y.; WANG, Q. Y.; PENG, J. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, p. 1627–1637, 2013.

APÊNDICE A - Apresenta os valores de escores das avaliações clínicas (Claudicação e Dor a flexão passiva) atribuídos de acordo com característica avaliada pelo membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M150 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD
		T	C	T	C	C	T	T	C	T	C
CLAUDICAÇÃO	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M15	2	0	0	0	0	3	1	0	0	0
	M30	3	0	0	0	0	2	2	0	0	0
	M45	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	M60	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	M90	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	M120	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	M210	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
DOR À FLEXÃO PASSIVA	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M15	1	0	0	0	1	2	2	1	2	0
	M30	1	0	0	0	0	1	3	0	2	0
	M45	0	0	0	0	0	1	3	0	2	0
	M60	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	M90	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	M120	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
	M210	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

APENDICE C - Apresenta os valores de escores das avaliações radiográficas atribuídos de acordo com característica avaliada pelo membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M60, M150 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

(continua)

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD
		T	C	T	C	C	T	T	C	T	C
AUMENTO TECIDOS MOLES	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M60	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0
	M210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PRESENÇA MINERALIZAÇÃO TEC. MOLES	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AUMENTO DA INTERLINHA RADIOGRÁFICA	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DIMINUIÇÃO INTERLINHA RADIOGRÁFICA	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EVIDÊNCIA DE OSTEÓFITOS E PROLIFERAÇÃO ÓSSEA	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M210	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
EVIDÊNCIA DE ENTESEÓFITO	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M60	2	1	1	1	0	3	0	0	1	1
	M210	1	1	1	1	2	2	1	0	1	1
ESCLEROSE SUBCONDRA	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OSTEÓLISE SUBONDRA	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M210	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0

(conclusão)

[illegible]

APENDICE D - Apresenta os valores de escores das avaliações ultrassonográficas (Líquido sinovial segundo aspecto, qualidade; cápsula articular segundo espessura) atribuídos de acordo com característica avaliada no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M150 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD
		T	C	T	C	C	T	T	C	T	C
LÍQUIDO SINOVIAL SEGUNDO O ASPETCTO	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M15	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	M30	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	M45	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	M60	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	M90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LÍQUIDO SINOVIAL QUANTO A QUALIDADE	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M15	1	0	0	0	0	1	0	1	2	1
	M30	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
	M45	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
	M60	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	M90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CÁPSULA ARTICULAR SEGUNDO A ESPESSEUDRA	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M15	3	3	2	2	0	2	2	1	0	0
	M30	3	3	2	2	0	2	2	2	2	0
	M45	2	3	2	0	2	2	2	1	1	0
	M60	3	3	2	0	2	2	2	1	0	0
	M90	3	3	1	0	2	2	2	0	0	0
	M120	2	3	0	0	2	2	1	0	0	1
	M210	2	2	0	0	2	2	1	0	0	1

APENDICE E - Apresenta os valores de escores das avaliações ultrassonográficas (Capsula articular segundo inserção e aspecto) atribuídos de acordo com característica avaliada nlo membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M150 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD
		T	C	T	C	C	T	T	C	T	C
CÁPSULA ARTICULAR SEGUNDO INSERÇÃO	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
	M45	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
	M60	2	1	1	1	0	2	1	0	0	1
	M90	2	1	1	1	0	2	1	1	0	0
	M120	2	1	2	1	1	3	1	2	0	1
	M210	2	1	2	1	1	1	0	2	0	0
CÁPSULA ARTICULAR SEGUNDO ASPECTO	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M15	2	2	1	1	1	2	2	1	0	0
	M30	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1
	M45	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1
	M60	2	2	0	0	1	1	1	0	1	1
	M90	2	2	0	0	1	0	1	0	1	1
	M120	2	2	0	0	2	0	1	0	0	1
	M210	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1

APENDICE F - Apresenta os valores de escores das avaliações ultrassonográficas (Superfície articular segundo a espessura da cartilagem articular, osso subcondral segundo superfície, osso subcondral segundo presença de osteófitos) atribuídos de acordo com característica avaliada no membro anterior esquerdo (medial e lateral) e direito (medial e lateral) nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M150 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1				A2				A3				A4				A5			
		MAE		MAD		MAE		MAD		MAE		MAD		MAE		MAD		MAE		MAD	
		T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
SUPERFÍCIE ARTICULAR SEGUNDO A ESPESSURA DA CARTILAGEM ARTICULAR	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M15	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	M30	3	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	M 45	2	0	3	0	2	0	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	M60	2	0	3	0	2	0	2	0	3	0	4	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	M90	2	0	3	0	2	0	2	0	3	0	3	1	3	0	3	0	2	0	3	0
	M120	2	0	3	0	2	0	2	0	3	0	2	1	3	0	3	0	2	0	2	0
	M210	1	0	3	0	2	0	2	0	3	0	2	1	3	0	2	0	2	0	2	0
OSSO SUBCONDORAL SEGUNDO SUPERFÍCIE	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M15	3	0	3	0	1	0	1	0	3	0	3	0	2	0	2	0	2	0	2	0
	M30	3	0	3	0	1	0	1	0	3	0	3	0	2	0	2	0	2	0	2	0
	M45	3	0	3	0	2	0	3	0	2	0	3	0	2	0	2	0	2	0	2	0
	M60	3	0	3	0	2	0	3	0	2	0	3	0	2	0	2	0	2	0	2	0
	M90	3	0	3	0	2	0	3	0	2	0	3	0	2	0	2	0	1	0	1	0
	M120	3	0	3	0	1	0	1	0	2	0	3	0	3	0	1	0	3	0	1	0
	M210	2	0	3	0	1	0	1	0	2	0	3	0	3	0	1	0	3	0	1	0
OSSO SUBCONDORAL SEGUNDO PRESENÇA DE OSTEÓFITOS	M0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M30	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	M45	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	M60	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M90	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M120	1	0	1	1	1	0	1	0	2	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	M210	1	0	1	1	1	0	1	0	2	1	2	1	0	0	0	1	0	0	1	0

APENDICE H - Apresenta os valores de escores para as avaliações físicas (Cor, aspecto e viscosidade) do líquido sinovial no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD
		T	C	T	C	C	T	T	C	T	C
COR DO LÍQUIDO SINOVIAL	M0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	M3	-	-	2	3	3	3	2	2	1	1
	M5	2	3	2	2	3	3	2	2	1	1
	M7	2	2	2	1	2	2	-	2	2	2
	M15	-	1	2	2	1	2	2	2	3	1
	M30	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1
	M45	1	1	3	1	1	1	3	3	3	1
	M60	2	1	2	1	1	1	3	3	1	1
	M90	-	-	-	-	-	-	2	2	1	1
	M120	1	1	2	1	1	2	1	3	1	1
	M210	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
ASPECTO DO LÍQUIDO SINOVIAL	M0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	M3	-	-	3	3	3	3	1	2	3	2
	M5	3	2	3	2	2	3	2	1	1	1
	M7	2	1	2	1	2	2	-	1	2	2
	M15	-	1	1	1	1	2	2	1	3	1
	M30	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1
	M45	1	1	3	1	1	1	3	2	3	1
	M60	1	1	2	1	1	1	3	3	1	1
	M90	-	-	-	-	-	-	1	2	1	1
	M120	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1
	M210	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
VISCOSIDADE DO LÍQUIDO SINOVIAL	M0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	M3	-	-	4	3	3	4	4	2	4	2
	M5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	M7	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	M15	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	M30	3	4	4	3	3	3	3	4	3	3
	M45	2	3	3	2	2	3	3	2	2	3
	M60	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	M90	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2
	M120	2	2	2	2	1	3	2	1	2	2
	M210	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2

APÊNDICE I - Apresenta os valores de uréia (mg/dL) no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE T	MAD C	MAE T	MAD C	MAE C	MAD T	MAE T	MAD C	MAE T	MAD C
URÉIA (mg/dL)	M0	52,00	30,60	N.T.	30,30	35,40	37,60	21,40	21,00	43,80	31,40
	M3	42,10	33,10	51,10	48,80	37,50	40,70	26,00	25,20	47,20	32,00
	M5	36,50	34,30	41,70	48,30	32,90	28,80	29,10	28,50	***	32,70
	M7	30,70	24,80	37,30	32,70	32,30	38,80	***	24,10	37,40	38,10
	M15	15,80	27,40	30,10	35,70	28,60	***	35,20	36,00	50,20	36,00
	M30	38,50	38,00	40,50	32,40	32,40	36,00	38,40	27,90	30,00	49,40
	M45	38,60	32,00	35,50	35,80	36,90	34,00	30,30	25,60	33,90	35,90
	M60	***	38,80	49,80	41,20	37,90	39,10	33,10	36,20	28,80	42,90
	M90	23,30	14,90	28,70	24,00	20,20	16,60	34,80	32,90	32,70	24,50
	M120	36,30	31,80	***	24,40	30,80	34,40	26,60	25,10	22,90	31,30
	M210	43,70	50,40	***	39,10	30,10	24,40	28,00	26,60	34,30	24,60

APÊNDICE J - Apresenta os valores de proteína (g/dL) no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE T	MAD C	MAE T	MAD C	MAE C	MAD T	MAE T	MAD C	MAE T	MAD C
PROTEÍNA (g/dl)	M0	0,8	0,6	0,6	0,6	1,0	1,2	0,8	0,8	1,0	0,4
	M3	-	-	5,4	3,4	3,4	5,8	3,4	1,8	3,8	1,0
	M5	3,8	1,6	4,0	2,2	2,2	4,2	4,4	2,6	2,2	0,4
	M7	2,8	0,8	2,8	0,8	2,4	3,7	-	1,8	2,0	0,2
	M15	-	0,6	0,8	1,0	0,8	2,4	4,0	3,0	2,4	0,8
	M30	1,0	1,4	1,2	2,4	0,8	1,6	2,0	1,2	0,4	0,2
	M45	0,8	0,6	4,8	0,8	1,2	2,6	3,0	1,8	3,6	1,6
	M60	1,4	0,6	2,2	0,8	0,6	1,4	1,4	2,0	0,8	0,8
	M90	-	-	-	-	-	-	1,4	2,2	0,8	0,6
	M120	0,8	0,8	3,2	1,0	0,8	2,2	1,6	3,0	0,6	0,6
	M210	1,2	0,8	1,6	0,8	1,8	2,0	1,6	1,2	0,6	1,0

APÊNDICE J' - Apresenta os valores de proteína corrigida por uréia (mg/mg de uréia) no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1	A1	A2	A2	A3	A3	A4	A4	A5	A5
		MAE T	MAD C	MAE T	MAD C	MAE C	MAD T	MAE T	MAD C	MAE T	MAD C
PROTEÍNA (mg/mg de uréia)	M0	15,4	19,6		19,8	26,6	33,9	37,4	38,1	22,8	12,7
	M3			105,7	69,7	83,5	154,7	130,8	71,4	80,5	31,3
	M5	104,1	46,6	95,9	45,5	76,4	127,7	151,2	91,2		12,2
	M7	91,2	32,3	75,1	24,5	61,9	114,6		74,7	53,5	5,2
	M15		21,9	26,6	28,0		83,9	113,6	83,3	47,8	22,2
	M30	26,0	36,8	29,6	74,1	22,2	49,4	52,1	43,0	13,3	4,0
	M45	20,7	18,8	135,2	22,3	35,3	70,5	99,0	70,3	106,2	44,6
	M60		15,5	44,2	19,4	15,3	36,9	42,3	55,2	27,8	18,6
	M90							40,2	66,9	24,5	24,5
	M120	22,0	25,2		41,0	23,3	71,4	60,2	119,5	26,2	19,2
	M210	27,5	15,9		20,5	73,8	66,4	57,1	45,1	17,5	40,7

APÊNDICE L - Apresenta os valores de PGE_2 (pg/ml) no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE T	MAD C	MAE T	MAD C	MAE C	MAD T	MAE T	MAD C	MAE T	MAD C
PGE_2 (pg/mL)	M0	42,9	***	113,1	281,6	30,2	37,7	29,4	72,5	51,3	49,0
	M3	147,1	36,0	213,1	76,6	54,7	108,6	332,6	28,3	173,4	30,7
	M5	139,9	34,7	289,7	162,1	381,5	730,4	730,4	101,2	1049,6	91,6
	M7	416,9	66,2	597,6	462,2	518,9	144,8	808,5	59,2	360,4	41,0
	M15	63,7	118,7	664,9	305,3	30,8	446,3	92,5	57,1	206,7	36,3
	M30	44,4	62,3	204,7	236,3	55,0	129,6	136,7	64,3	47,3	15,5
	M45	136,7	112,2	310,2	200,5	39,4	259,8	127,6	42,1	158,9	65,6
	M60	93,7	110,7	162,7	23,3	28,1	82,4	59,3	35,1	26,8	33,3
	M90	58,4	73,1	85,2	184,5	51,1	140,7	32,3	35,3	20,8	21,5
	M120	53,8	36,5	***	150,1	83,7	216,8	70,7	56,3	135,0	60,3
	M210	52,7	200,5	74,9	71,0	43,2	53,4	72,3	44,9	49,7	139,8

APÊNDICE L' - Apresenta os valores de PGE₂ (pg/mg de uréia) corrigido por uréia no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE T	MAD C	MAE T	MAD C	MAE C	MAD T	MAE T	MAD C	MAE T	MAD C
PGE ₂ (pg/mg de uréia)	M0	82,5	***	***	929,4	80,4	106,6	137,3	345,4	117,2	156,0
	M3	349,5	108,7	417,0	156,9	134,5	289,7	1279,1	112,5	367,5	96,1
	M5	383,3	101,2	694,8	335,7	1324,7	2220,0	2509,9	355,0	***	280,1
	M7	1357,8	266,8	1602,0	1413,5	1337,4	448,4	***	245,7	963,5	107,7
	M15	403,4	433,3	2208,9	855,1	***	1560,6	262,8	158,5	411,7	100,9
	M30	115,4	163,9	505,5	729,2	152,9	400,1	356,1	230,6	157,6	31,5
	M45	354,1	350,7	873,9	559,9	115,8	704,1	421,0	164,3	468,8	182,6
	M60	***	285,3	326,7	56,5	72,0	217,3	179,2	97,1	93,2	77,6
	M90	250,5	490,8	296,9	768,8	307,5	696,3	92,7	107,4	63,6	87,6
	M120	148,2	114,8	***	615,3	243,3	704,0	265,9	224,5	589,5	192,6
	M210	120,6	397,8	***	181,6	177,2	177,3	258,3	168,8	145,0	568,1

APÊNDICE M – Apresenta exemplo da leitura da placa 2 de ELISA para determinar a concentração de IL-1 β – São Paulo – 2015

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	>8396,875	6716,563	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
B	5646,005	3200,85	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
C	2009,131	1780,591	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
D	1174,296	863,112	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
E	624,866	386,314	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
F	306,437	270,171	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
G	162,585	138,85	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
H	<0,000	45,009	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong

APÊNDICE N – Apresenta exemplo da leitura da placa 2 de ELISA para determinar a concentração de TNF α – São Paulo – 2015

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	>1049,220	900,772	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
B	530,98	473,694	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
C	257,5	226,379	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
D	170,231	109,001	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
E	47,261	65,321	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
F	28,417	19,569	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
G	30,785	12,784	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong
H	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	Cong

APÊNDICE O - Apresenta os valores da concentração de Condroitin sulfato ($\mu\text{g/ml}$) no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE T	MAD C	MAE T	MAD C	MAE C	MAD T	MAE T	MAD C	MAE T	MAD C
Condroitin Sulfato ($\mu\text{g/ml}$)	M0	52,00	30,60	***	30,30	35,40	37,60	21,40	21,00	43,80	31,40
	M3	42,10	33,10	51,10	48,80	37,50	40,70	26,00	25,20	47,20	32,00
	M5	36,50	34,30	41,70	48,30	32,90	28,80	29,10	28,50	***	32,70
	M7	30,70	24,80	37,30	32,70	32,30	38,80	***	24,10	37,40	38,10
	M15	15,80	27,40	30,10	35,70	28,60	***	35,20	36,00	50,20	36,00
	M30	38,50	38,00	40,50	32,40	32,40	36,00	38,40	27,90	30,00	49,40
	M45	38,60	32,00	35,50	35,80	36,90	34,00	30,30	25,60	33,90	35,90
	M60	***	38,80	49,80	41,20	37,90	39,10	33,10	36,20	28,80	42,90
	M90	23,30	14,90	28,70	24,00	20,20	16,60	34,80	32,90	32,70	24,50
	M120	36,30	31,80	***	24,40	30,80	34,40	26,60	25,10	22,90	31,30
	M210	43,70	50,40	***	39,10	30,10	24,40	28,00	26,60	34,30	24,60

APÊNDICE O' - Apresenta os valores de Condroitin sulfato (mg/mg de uréia) corrigido por uréia no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M15, M30, M45, M60, M 90, M120 e M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE T	MAD C	MAE T	MAD C	MAE C	MAD T	MAE T	MAD C	MAE T	MAD C
Condroitin Sulfato (mg/ml)	M0	0,23	***	***	0,10	0,10	0,06	0,61	0,42	0,64	0,62
	M3	0,64	1,13	0,09	0,36	0,31	1,01	0,16	1,14	0,28	0,97
	M5	0,30	0,17	0,14	0,09	0,16	0,08	0,07	0,41	***	0,62
	M7	0,14	0,17	0,06	0,13	0,08	0,26	***	0,22	0,18	0,12
	M15	0,03	0,02	0,07	0,13	***	0,06	0,07	0,15	0,05	0,04
	M30	0,16	0,05	0,02	0,06	0,03	0,06	0,04	0,17	0,03	0,03
	M45	0,06	0,05	0,01	0,05	0,07	0,04	0,03	0,11	0,03	0,12
	M60	***	0,07	0,02	0,05	0,03	0,09	0,17	0,08	0,04	0,05
	M90	0,10	0,16	0,08	0,08	0,22	0,05	0,09	0,09	0,06	0,03
	M120	0,07	0,02	***	0,07	0,03	0,11	0,05	0,03	0,06	0,02
	M210	0,06	0,03	***	0,03	0,12	0,07	0,21	0,07	0,15	0,22

APÊNDICE P - Apresenta os valores da concentração de ácido hialurônico (µg/ml) no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M3, M5, M7, M15, M30, M45, M60, M90, M120 e M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE T	MAD C	MAE T	MAD C	MAE C	MAD T	MAE T	MAD C	MAE T	MAD C
Ácido Hialurônico (µg/ml)	M0	587,63	***	535,18	319,86	368,77	324,09	419,97	458,87	361,15	305,30
	M3	192,31	359,54	115,07	707,12	768,03	164,13	76,72	980,55	151,28	407,75
	M5	191,72	173,20	264,25	315,02	151,90	76,90	73,19	552,52	54,38	261,12
	M7	186,03	173,17	132,12	148,25	155,94	286,30	58,05	351,66	220,83	241,53
	M15	32,90	96,14	147,84	145,44	266,79	146,68	85,62	283,69	153,70	144,23
	M30	276,66	319,67	227,70	291,21	326,41	194,84	172,66	703,82	178,95	261,05
	M45	286,92	358,70	194,11	430,54	366,28	126,98	140,47	229,91	184,21	186,22
	M60	281,84	247,68	412,12	395,20	224,49	131,56	584,02	400,41	240,14	411,44
	M90	482,72	403,07	391,65	460,87	295,82	233,84	376,01	362,49	268,22	383,49
	M120	440,76	415,83	***	367,05	346,90	397,28	592,03	383,60	273,73	490,62
	M210	507,94	528,82	499,30	360,47	407,90	401,42	682,43	347,11	274,23	318,69

APÊNDICE P' - Apresenta os valores da concentração de ácido hialurônico (mg/mg de uréia) corrigidos por uréia no membro anterior esquerdo e direito nos momentos M0, M3, M5, M7, M15, M30, M45, M60, M90, M120 e M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE T	MAD C	MAE T	MAD C	MAE C	MAD T	MAE T	MAD C	MAE T	MAD C
Ácido Hialurônico (mg/mg de uréia)	M0	1,13	***	***	1,06	0,98	0,92	1,96	2,19	0,82	0,97
	M3	0,46	1,09	0,23	1,45	1,89	0,44	0,30	3,89	0,32	1,27
	M5	0,53	0,50	0,63	0,65	0,53	0,23	0,25	1,94	***	0,80
	M7	0,61	0,70	0,35	0,45	0,40	0,89	***	1,46	0,59	0,63
	M15	0,21	0,35	0,49	0,41	***	0,51	0,24	0,79	0,31	0,40
	M30	0,72	0,84	0,56	0,90	0,91	0,60	0,45	2,52	0,60	0,53
	M45	0,74	1,12	0,55	1,20	1,08	0,34	0,46	0,90	0,54	0,52
	M60	***	0,64	0,83	0,96	0,57	0,35	1,76	1,11	0,83	0,96
	M90	2,07	2,71	1,36	1,92	1,78	1,16	1,08	1,10	0,82	1,57
	M120	1,21	1,31	***	1,50	1,01	1,29	2,23	1,53	1,20	1,57
	M210	1,16	1,05	***	0,92	1,67	1,33	2,44	1,30	0,80	1,30

APÊNDICE Q - Apresenta os valores dos escores macroscópicos ICRS do tecido de reparo no membro anterior esquerdo e direito em M210 dos animais A1, A2, A3, A4 e A5 – São Paulo – 2013-14

		A1		A2		A3		A4		A5	
		MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD	MAE	MAD
		T	C	T	C	C	T	T	C	T	C
Grau de reparo em relação ao nível da cartilagem ao redor	M210	3	3	4	3	2	3	4	2	3	2
Integração na zona de borda	M210	2	1	2	1	1	2	3	1	3	1
Aparência macroscópica	M210	2	2	3	1	1	1	4	2	2	2
Avaliação global do reparo	M210	7	6	9	5	4	6	11	5	8	5
GRAU	M210	G3	G3	G2	G3	G3	G3	G2	G3	G2	G3