THAÍS SODRÉ DE LIMA MACHADO

**Análise clínica e estrutural de processos de osteocondrite
dissecante da articulação tíbio-társica de equinos**

São Paulo
2010

THAÍS SODRÉ DE LIMA MACHADO

**Análise clínica e estrutural de processos de osteocondrite
dissecante da articulação tíbio-társica de equinos**

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva

São Paulo
2010

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
11/2/10

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2250
FMVZ

Machado, Thaís Sodré de Lima

Análise clínica e estrutural de processos de osteocondrite dissecante da articulação tíbio-társica de equinos / Thaís Sodré de Lima Machado. -- 2010.
138 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

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

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

1. Ácido hialurônico. 2. Condroitim sulfato. 3. Glicosaminoglicano. 4. COMP.
5. Cartilagem. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise clínica e estrutural de processos de osteocondrite dissecante da articulação tíbio-társica de eqüinos", protocolado sob o nº1238/2007, utilizando acima de 12 (doze) eqüinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Clinical and structural analysis of osteochondritis dissecans in the tibiotarsal joint in horses", protocol number 1238/2008, utilizing 12 (twelve) equines, under the responsibility Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 20 de março de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MACHADO, Thaís Sodré de Lima

Título: Análise clínica e estrutural de processos de osteocondrite dissecante da articulação tíbio-társica de equinos

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr	Instituição:
Assinatura:	Julgamento:
Prof. Dr	Instituição:
Assinatura:	Julgamento:
Prof. Dr	Instituição:
Assinatura:	Julgamento:
Prof. Dr	Instituição:
Assinatura:	Julgamento:
Prof. Dr	Instituição:
Assinatura:	Julgamento:

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Leda e Gentil, que me proporcionaram uma vida cheia de amor e sempre incentivaram os meus sonhos. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. O meu amor e gratidão por vocês são imensos.

Ao meu amor Fábio, com quem sigo um caminho repleto de amor e amizade, que esteve sempre ao meu lado, vibrando com minhas conquistas e me animando nos momentos difíceis.

Ao meu amorzinho Cecília, que deixou minha vida repleta de ternura e alegria.

A todos os meus verdadeiros e queridos amigos, minha família do coração, que sempre torceram pelo sucesso deste trabalho.

DEDICATÓRIAS

Ao meu querido orientador, Professor Luis Cláudio, que me acompanha desde o início e é grande responsável pela minha formação profissional. Obrigada pela amizade, convivência, oportunidade e confiança.

A querida Dra Yara Michelacci, que me acolheu com tanto carinho e se dedicou intensamente a este trabalho. Obrigada pelos preciosos ensinamentos, pelo incentivo nos momentos de desânimo, pelas longas conversas e pela nova amizade.

AGRADECIMENTOS

A amiga Professora Raquel Baccarin pela especial ajuda e interesse no desenvolvimento do trabalho.

A amiga Cristina Massoco pela ajuda inicial na criação deste projeto.

A querida amiga Silvia Cortopassi, pela verdadeira amizade construída ao longo destes anos e por estar sempre presente e disposta a ajudar no que for preciso.

Aos funcionários da Clínica Cirúrgica de Grandes Animais, Henrique Fragoso e Cícero Antônio da Silva pela indispensável ajuda em lidar com os animais.

Ao querido Fábio Machado pelas lindas ilustrações.

As queridas Aline Mendes e Elsa Yoko, pela paciência e por estarem sempre dispostas a ajudar e pelo auxílio na realização das análises dos glicosaminoglicanos e COMP.

Aos Professores Wilson Roberto Fernandes, André Zoppa, Carla Belli e Aline Ambrósio pelos agradáveis anos de convivência.

Aos colegas de pós-graduação da USP, Edivaldo Nunes, Paulo Leria, Julio Spagnolo, Paulo Frazão, Mariana Chaparro, Teresa Souto, Keila Kazue, Luciana Raserá Ewaldo de Mattos, Haley Carvalho e Andreza Conti, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de pós-graduação da Unifesp, Jair Aguiar, Cilene Lima, Giovanni Peres e Renata Aquino pelas "dicas de sobrevivência" neste meu novo universo, chamado laboratório.

A colega Ana Paula Moraes pelo auxílio na elaboração das cromatografias.

Ao professor João Roberto pela preciosa ajuda na avaliação do Ácido Hialurônico.

Aos professores Maria Lucia Zaidan Dagli e Frederico Azevedo da Costa Pinto pela realização da análise histológica.

As técnicas dos laboratórios do Departamento de Clínica Médica, Clara, Maria Luisa, Maria Helena, Marly e Cláudia, pelo auxílio no processamento do material e na realização das análises laboratoriais complementares.

Aos técnicos dos laboratórios do Departamento de Patologia, Cláudio, Luciano e Marguite, pela confecção de lindas lâminas para a análise histológica.

A Professora Ana Liz, pelas relevantes considerações durante a qualificação desta tese.

As funcionárias da biblioteca, Helena, Solange, Rose e Elsa, pela preciosa ajuda na busca por artigos e na formatação da tese.

Aos funcionários Cláudia, Daisy, Ney e Alessandra, pela carinhosa orientação sobre assuntos burocráticos relativos à pós-graduação.

Ao Dr. Misumi por gentilmente ceder os anticorpos para os testes com a COMP.

Aos cavalos utilizados neste estudo, sem eles nada disso seria possível.

RESUMO

MACHADO, T. S. L. **Análise clínica e estrutural de processos de osteocondrite dissecante da articulação tíbio-társica de equinos.** [Clinical and structural analysis of osteochondritis dissecans in the tibiotarsal joints of horses]. 2010. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A osteocondrite dissecante (OCD) é uma doença que surge nos equinos durante a fase de desenvolvimento sendo caracterizada pela presença de fragmento osteocondral intra-articular. Pouco se sabe sobre a condição da articulação doente em animais mais velhos, principalmente nos casos assintomáticos, que são operados muitas vezes com a finalidade de comercialização posterior ou para impedir a progressão da doença. A finalidade deste estudo, portanto, foi analisar as articulações tíbio-társicas de equinos com idade superior a um ano apresentando OCD na crista intermédia da tíbia, e comparar animais saudáveis (grupo controle) com animais acometidos de OCD nas formas sintomática e assintomática, empregando análise física; contagem de células totais, dosagem de proteína total, análise de glicosaminoglicanos (GAGs) e da proteína oligomérica da matriz cartilágnea (COMP) no líquido sinovial; análise dos GAGs urinários e análise histológica da membrana sinovial e fragmento osteocondral. Os eqüinos utilizados foram divididos em três grupos. No Grupo I foram utilizados eqüinos clinicamente sadios, livres de doença na articulação tíbio-társica. Os Grupos II e III foram constituídos por animais portadores de OCD nas formas sintomática e assintomática respectivamente, atendidos e operados no Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário – FMVZ-USP. A presença de sinais clínicos esteve mais relacionada com a presença de múltiplos fragmentos do que com a de fragmento osteocondral único, independente de seu tamanho. O sinal clínico mais observado nos animais do Grupo III foi a efusão articular. As principais alterações encontradas no líquido sinovial foram: o aumento na concentração de condroitim sulfato (CS) no Grupo II ($P < 0,01$) e no Grupo III ($P < 0,001$) em relação ao Grupo I; o aumento na concentração de ácido hialurônico associado à diminuição da viscosidade nos animais do Grupo III; e a redução na presença de fragmentos de alto peso molecular associado ao aumento de fragmentos de baixo peso molecular de COMP nos animais dos

Grupos II e III. A análise dos GAGs urinários evidenciou aumento na proporção de CS nos animais dos Grupos II e III em relação ao Grupo I. Na análise histológica dos fragmentos osteocondrais foram observadas alterações na integridade da cartilagem articular, associada a proliferação de condrócitos e a redução na presença de proteoglicanos tanto no Grupo II como no Grupo III. As amostras de membrana sinovial do Grupo I apresentaram presença discreta de vilos e sinoviócitos. No Grupo II houve aumento moderado nas vilosidades sinoviais, e na maior parte das amostras avaliadas no Grupo III, além da presença moderada a severa de vilosidades sinoviais, foi observada proliferação intensa de sinoviócitos. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a OCD na articulação tíbio-társica de equinos com idade superior a um ano representa processo ativo, com degradação da MEC da cartilagem articular, independente da presença de sinais clínicos, e que o tratamento cirúrgico é indicado, mesmo em animais assintomáticos, buscando interromper o processo de degradação cartilagínea e prevenir o desenvolvimento de doença articular degenerativa, particularmente em equinos que irão iniciar treinamento atlético esportivo.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Condroitim sulfato. Glicosaminoglicano. COMP. Cartilagem.

ABSTRACT

MACHADO, T. S. L. **Clinical and structural analysis of osteochondritis dissecans in the tibiotarsal joints of horses.** [Análise clínica e estrutural de processos de osteocondrite dissecante da articulação tíbio-társica de equinos.]. 2010. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Osteochondritis dissecans (OCD) is an orthopedic disease that appears in foals during growth phase and is characterized by the presence (occurrence???) of an osteochondral fragment in the articular space. There are few studies in the literature concerning the follow up of the disease in adult horses, mainly those without clinical signs, which are submitted to surgical treatment to commercial proposes or to prevent the progression of the disease. The objective of the present study was to analyze tibiotarsal joints of horses older than one year with OCD in the intermediate ridge of distal tibia and compare healthy animals (control group) with OCD horses, either with or without clinical signs. Synovial fluid was analyzed to total cell count, total protein concentration, and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) fragmentation. The synovial fluid and urine glycosaminoglycans (GAGs) were evaluated. The synovial membrane and osteochondral fragment were analyzed by histological assessment. Horses were divided in three groups: healthy horses without joint disease (Group I), horses with OCD without clinical sings (Group II) and horses with OCD and clinical signs (Group III). Horses of Groups II and III were admitted to the Large Animal Surgery Session of the Veterinary Hospital – FMVZ – USP. The presence of clinical signs was more related with multiple articular fragments than with one fragment, irrespective of the size. The most common clinical sign observed in Group III was joint effusion. The main changes in synovial fluid were: increase in chondroitin sulfate (CS) in Groups II ($P<0,01$) and III ($P<0,001$) when compared with Group I; increase in hyaluronic acid (HA) concentration associated with decrease in the viscosity in Group III; and the decrease of COMP fragments of higher molecular weight associated with increase of fragments of low molecular weight in Group II and III. The proportion of urinary CS was increased in Group II and III when compared with Group I. Alterations in the articular cartilage integrity associated with chondrocytes proliferation and loss of proteoglycan were observed in the histological analysis of the osteochondral

fragments. In Group I the presence of synovial vilos and synoviocytes in the synovial membrane samples was discreet. In Group II samples there were a moderate increase in the presence of synovial vilos and synoviocytes. In almost samples analyzed in Group III the presence of synovial vilos was moderate to severe and synoviocytes proliferation was intense. Our results indicate that OCD in tibiotarsal joint of horses older than one year represents an active process, with degradation of the extra cellular matrix of the articular cartilage, regardless the presence of clinical signs, indicating surgical treatment, even in assymptomatic horses, avoiding the progression of cartilage degradation process and preventing the development of degenerative joint disease, mainly in horses that are going to begin athletic training.

Key words: Hyaluronic acid. Chondroitin sulfate. Glycosaminoglycan. COMP. Cartilage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração representando as cadeias polipeptídicas $\alpha 1(\text{II})$ que formam a molécula de colágeno tipo II	31
Figura 2 - Ilustração representando moléculas de colágeno tipo IX (laranja e vermelho) associadas a fibrilas de colágeno tipo II	32
Figura 3 - Ilustração do agregado formado por moléculas de agrecam (AG) ligadas a uma molécula de ácido hialurônico (AH)	36
Figura 4 - Esquema da localização de alguns componentes da MEC da cartilagem	37
Figura 5 - Ilustração representando duas moléculas de agrecam ligadas a uma molécula de ácido hialurônico. Note que a molécula menor foi quebrada, perdendo parte do domínio CS2 e o domínio G3.....	38
Figura 6 - Ilustração representando moléculas de agrecam com comprimentos diversos ligadas ao ácido hialurônico	39
Figura 7 - Ilustração demonstrando a estrutura pentamérica da COMP com monômeros (verdes) unidos por um centro globular (roxo)	42
Figura 8 - Esquema mostrando o processo de ossificação endocondral.....	45
Figura 9 - Ilustração radiográfica em projeção dorsomedial-plantarolateral do fragmento osteocondral proveniente da crista intermédia da tíbia (seta branca) - São Paulo - 2006/2009	64
Figura 10 - Ilustração artroscópica de fragmento osteocondral na crista intermédia da tíbia (A), remoção do fragmento (B), mesmo local depois da retirada do fragmento (C) e curetagem (D) - São Paulo - 2006/2009	66
Figura 11 - Ilustração artroscópica da colheita de fragmentos de membrana sinovial. (A) aspecto geral da membrana sinovial; (B) colheita do material com auxílio de pinça de biópsia - São Paulo - 2006/2009...	68
Figura 12 - Esquema do processo de preparação de COMP a partir de cartilagem articular equina - São Paulo - 2006/2009	73
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos urinários de cavalos hígidos (GI). P: padrão de gags contendo CS, DS e HS, 5 μ g cada - São Paulo - 2006/2009	88
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos urinários de cavalos assintomáticos com OCD bilateral na articulação tíbio-társicas (GII). P: padrão de gags contendo CS, DS e HS, 5 μ g cada - São Paulo - 2006/2009	89

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos urinários de cavalos sintomáticos com OCD na articulação tíbio-társicas (GIII). P: padrão de gags contendo CS, DS e HS, 5µg cada - São Paulo - 2006/2009	89
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos de líquido sinovial de articulações de cavalos hígidos (GI). P1: mistura padrão de gags contendo CS, HS e DS 5 µg cada; AH: AH padrão, 5 µg - São Paulo - 2006/2009	93
Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos de líquido sinovial de articulações tíbio-társicas de cavalos com ocd sintomática (GII). P1: mistura padrão de gags contendo CS, HS e DS 5 µg cada; AH: AH padrão, 5 µg - São Paulo - 2006/2009	93
Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos de líquido sinovial de articulações tíbio-társicas de cavalos com ocd assintomática (GIII). P1: mistura padrão de gags contendo CS, HS e DS 5 µg cada; AH: AH padrão, 5 µg - São Paulo - 2006/2009	94
Figura 19 - <i>Immunoblotting</i> revelado com anticorpo MST1, que reconhece queratam sulfato extraído de urina (A) e líquido sinovial (B) de cavalos hígidos (GI) - São Paulo - 2006/2009	99
Figura 20 - Curvas de eluição de proteínas (linha azul, OD 280 nm) e de proteoglicanos (linha rosa, DMB) na coluna de deae-sepharose - São Paulo - 2006/2009	100
Figura 21 - SDS-PAGE das frações da coluna de DEAE Sepharose, corado com Coomassie Blue - São Paulo - 2006/2009	100
Figura 22 - <i>Dot blotting</i> das frações da coluna de DEAE Sepharose demonstrando maior intensidade de reação com anticorpo anti-COMP equino no intervalo entres as frações 40 e 76 - São Paulo - 2006/2009	101
Figura 23 - <i>Western blotting</i> das frações 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 78 reveladas com anticorpo anti-COMP equino - São Paulo - 2006/2009	101
Figura 24 - <i>Immunoblotting</i> e perfil migratório da COMP em amostras de líquido sinovial. A: amostra de líquido sinovial do Grupo I (controle); B: amostra de líquido sinovial do Grupo III (OCD sintomática); C: sobreposição dos padrões migratórios - São Paulo - 2006/2009	102
Figura 25 - Perfil migratório da COMP em amostras de líquido sinovial. A: COMP padrão; B: amostra de líquido sinovial do Grupo II (OCD assintomática); C: amostra de líquido sinovial do Grupo III (OCD sintomática); C: sobreposição dos padrões migratórios - São Paulo - 2006/2009	103
Figura 26 - Fotomicrografia de membrana sinovial do Grupo I (controle) com presença discreta de vilos delimitados por camada única de sinoviócitos. HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009	104

Figura 27 - Fotomicrografia de membrana sinovial do Grupo III (OCD sintomática) com presença moderada de vilos. HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009	105
Figura 28 - Fotomicrografia de membrana sinovial do Grupo III (OCD sintomática) com presença intensa de vilos. HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009	105
Figura 29 - Fotomicrografia de vilos de membrana sinovial do Grupo III (ocd sintomática) com presença intensa de sinoviócitos (setas). HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009	106
Figura 30 - Fotomicrografia de vilos de membrana sinovial do Grupo III (OCD sintomática) com presença intensa de sinoviócitos. HE, barra = 50µm - São Paulo - 2006/2009	106
Figura 31 - Fotomicrografia de fragmento osteocondral do Grupo III (OCD sintomática) com presença de fibrilação da cartilagem. HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009	107
Figura 32 - Fotomicrografia de fragmento osteocondral do Grupo III (OCD sintomática) com presença de fibrilação e eburnação da cartilagem. HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009.....	108
Figura 33 - Fotomicrografia de cartilagem de fragmento osteocondral do Grupo III (OCD sintomática) com presença de proliferação de condrócitos (setas). HE, barra = 50µm - São Paulo - 2006/2009.....	108
Figura 34 - Corte histológico de fragmento osteocondral do Grupo III (OCD sintomática) com coloração metacromática com azul de toluidina, indicando a presença de PGs. A) barra = 200µm; B) barra = 150µm - São Paulo - 2006/2009	109
Figura 35 - Corte histológico de fragmento osteocondral com coloração metacromática com azul de toluidina, indicando a diferença de concentração de PGs em diferentes regiões de um mesmo fragmento osteocondral do Grupo III (OCD sintomática). barra = 200µm - São Paulo - 2006/2009	109

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Distribuição das formas de OCD unilateral e bilateral entre os Grupos II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 79
- Gráfico 2 - Densidade de frequência de sinal clínico com a presença de fragmento osteocondral único e a de múltiplos fragmentos nos Grupos II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 80
- Gráfico 3 - Porcentagem (%) da classificação quanto à coloração do líquido sinovial nos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 84
- Gráfico 4 - Porcentagem (%) da classificação quanto ao aspecto do líquido sinovial nos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 85
- Gráfico 5 - Porcentagem (%) da classificação da viscosidade do líquido sinovial nos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 86
- Gráfico 6 - Relação entre concentração de ácido hialurônico e viscosidade do líquido sinovial nos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 86
- Gráfico 7 - Contagem global de células/mm³ do líquido sinovial dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 87
- Gráfico 8 - Concentração da proteína total (g/dl) do líquido sinovial dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 88
- Gráfico 9 - Concentração urinária de glicosaminoglicanos nos animais dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD com sintomatologia unilateral e bilateral) - São Paulo - 2006/2009 92
- Gráfico 10 - Porcentagem (%) de condroitim sulfato em relação aos glicosaminoglicanos urinários totais nos animais dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD com sintomatologia unilateral e bilateral) - São Paulo - 2006/2009 92
- Gráfico 11 - Representação gráfica da concentração de ácido hialurônico no líquido sinovial das articulações dos animais dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 97

Gráfico 12 - Concentração de condroitim sulfato (cs) no líquido sinovial das articulações dos animais dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 .. 97

Gráfico 13 – Relação entre as concentrações de condroitim sulfato (cs) e de ácido hialurônico (ah) no líquido sinovial dos animais dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos fragmentos osteocondrais das articulações dos Grupos II e III - São Paulo - 2006/2009	80
Tabela 2 - Características do líquido sinovial de articulações sem OCD (GI) - São Paulo - 2006/2009.....	81
Tabela 3 - Características do líquido sinovial de articulações com OCD assintomáticas (GII) - São Paulo - 2006/2009.....	82
Tabela 4 - Características do líquido sinovial de articulações com OCD sintomáticas (GIII) - São Paulo - 2006/2009.....	83
Tabela 5 - Concentração de GAGs urinários dos animais do Grupo controle (GI) - São Paulo - 2006/2009	90
Tabela 6 - Concentração de GAGs urinários dos animais com OCD assintomática unilateral e bilateral (GII) - São Paulo - 2006/2009	90
Tabela 7- Concentração de gags urinários dos animais com OCD sintomática unilateral (GIII) - São Paulo - 2006/2009	91
Tabela 8 - Concentração de GAGs urinários dos animais com OCD sintomática bilateral (GIII) - São Paulo - 2006/2009	91
Tabela 9 - Concentração de GAGs no líquido sinovial das articulações do Grupo controle (GI) - São Paulo - 2006/2009	94
Tabela 10 - Concentração de GAGs no líquido sinovial das articulações com OCD assintomática (GII) - São Paulo - 2006/2009	95
Tabela 11 - Concentração de GAGs no líquido sinovial das articulações com OCD sintomática (GIII) - São Paulo - 2006/2009	96
Tabela 12 - Alterações histológicas observadas nos fragmentos osteocondrais das articulações do Grupo II (OCD assintomática) e Grupo III (OCD sintomática) - São paulo - 2006/2009	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição dos dissacarídeos típicos dos glicosaminoglicanos e respectivas ligações glicosídicas.....	33
Quadro 2 - Articulações com OCD assintomáticas (GII) - São Paulo - 2006/2009	62
Quadro 3 - Articulações com ocd sintomáticas (GIII) - São Paulo - 2006/2009	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	ácido hialurônico
ADAMTS	uma disintegrina e metaloproteinase com motivos trombospondina (<i>A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs</i>)
BH	Brasileiro de Hipismo
BSA	soro albumina bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Cetavlon	brometo de cetiltrimetilamônio
CS	condroitim sulfato
COMP	proteína oligomérica da matriz da cartilagem (<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>)
Da	Daltons
DMB	azul de 1,9-dimetilmetileno
DOD	doença ortopédica do desenvolvimento
DS	dermatam sulfato
FACIT	colágeno associado a fibrilas com tripla hélice interrompida (<i>Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helix</i>)
G	gravidades
g/dL	grama por decilitro
g/L	grama por litro
GAG	glicosaminoglicano
GuHCl	hidrocloro de guanidina
HAS	hialuronam sintase (<i>Hyaluronic Acid Synthase</i>)
Hep	heparina
HPLC	cromatografia líquida de alta performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS	heparam sulfato
IGD	domínio interglobular
IV	intravenoso
kg	quilograma
kDa	quiloDaltons
M	molar
MEC	matriz extracelular
mg	miligrama

mg/kg	miligrama por quilograma
mg/L	miligrama por litro
mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
MM	Mangalarga Marchador
MMP	metaloproteinase
NaCl	cloreto de sódio
NC ₃	não-colágeno (<i>Non Collagen</i>)
ng	nanograma
ng/ml	nanograma por mililitro
nm	nanômetro
OA	osteoartrite
OC	osteocondrose
OCD	osteocondrite dissecante
OPD	ortofenileno diamino
PBS	salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBST	salina tamponada com fosfato contendo Tween 20 0,05% (<i>Phosphate Buffered Saline containing 0,05% Tween 20</i>)
PDA	1,3-diaminopropano-acetato
PG	proteoglicano
PSA	Puro Sangue Árabe
PSL	Puro Sangue Lusitano
SDSPAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SRLP	proteína pequena rica em leucina (<i>Small Leucine Rich Protein</i>)
TBS	salina tamponada com Tris (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TBST	salina tamponada com Tris contendo Tween 20 0,05% (<i>Tris Buffered Saline containing 0,05% Tween 20</i>)
Tris-HCl	tampão Tris(hidroximetil)-aminometano – ácido clorídrico
µg	micrograma
µg/ml	micrograma por mililitro
µl	microlitro
µm	micrômetro
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 ARTICULAÇÕES DIARTRODIAIS.....	26
2.1.1 Líquido Sinovial.....	26
2.1.2 Cápsula Articular.....	27
2.1.3 Cartilagem Articular	30
2.1.3.1 Macromoléculas da cartilagem articular.....	31
2.1.3.1.1 <i>Colágeno</i>	31
2.1.3.1.2 <i>Proteoglicanos</i>	32
2.1.3.1.3 <i>Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem</i>	41
2.2 OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA.....	44
2.3 OSTEOCONDROSE	46
2.4 OSTEOCONDRITE DISSECANTE	48
2.5 BIOMARCADORES.....	51
2.5.1 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos.....	52
2.5.2 Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem (COMP).....	56
3 JUSTIFICATIVA	59
4 OBJETIVO.....	60
5 MATERIAL e MÉTODOS	61
5.1 ANIMAIS	61
5.2 EXAME RADIOGRÁFICO	63
5.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E ARTROSCÓPICO	64
5.4 COLHEITA DE MATERIAL	66
5.4.1 Urina	66
5.4.2 Líquido Sinovial.....	67
5.4.3 Membrana Sinovial.....	67
5.4.4 Fragmento osteocondral	68

5.5 ANÁLISE DO MATERIAL	68
5.5.1 Análise física do líquido sinovial.....	69
5.5.2 Contagem global e diferencial das células do líquido sinovial	69
5.5.3 Dosagem da proteína total do líquido sinovial.....	69
5.5.4 Extração dos GAGs urinários e do líquido sinovial	70
5.5.5 Identificação dos GAGs urinários e do líquido sinovial	70
5.5.6 Detecção do queratam sulfato (KS) urinário e do líquido sinovial por immunoblotting	71
5.5.7 Preparação da COMP da cartilagem articular.....	72
5.5.8 Detecção da COMP por immunoblotting	75
5.5.9 Dosagem de creatinina.....	76
5.5.10 Análise histológica dos tecidos.....	76
5.5.10.1 Membrana sinovial	76
5.5.10.2 Fragmento Osteocondral	76
5.5.11 Análise Estatística	77
6 RESULTADOS.....	78
6.1 ANIMAIS	78
6.2 FRAGMENTO OSTEOCONDRA.....	79
6.3 ANÁLISE FÍSICA, CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DAS CÉLULAS E DOSAGEM DA PROTEÍNA TOTAL DO LÍQUIDO SINOVIAL	81
6.3.1 Análise física do líquido sinovial.....	83
6.3.2 Contagem global de células do líquido sinovial	87
6.3.3 Dosagem de proteína total do líquido sinovial.....	87
6.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS GAGS URINÁRIOS	88
6.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS GAGS DO LÍQUIDO SINOVIAL....	93
6.6 DETERMINAÇÃO DE QUERATAM SULFATO (KS) POR IMMUNOBLOTTING....	98
6.7 PREPARAÇÃO DA COMP DA CARTILAGEM ARTICULAR	99
6.8 DETECÇÃO DA COMP DO LÍQUIDO SINOVIAL POR IMMUNOBLOTTING	102
6.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TECIDOS.....	103
6.9.1 Membrana sinovial	103
6.9.2 Fragmento osteocondral	106

7 DISCUSSÃO	110
8 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS	122
ANEXO	137

1 INTRODUÇÃO

A osteocondrite dissecante é uma doença que acomete potros durante a fase de desenvolvimento. A lesão primária, causada por falha no processo de ossificação endocondral, resulta na formação de um fragmento osteocondral, que pode permanecer aderido ao osso subjacente ou ficar livre na cavidade articular. A presença deste fragmento pode levar ao desequilíbrio do ambiente articular, propiciando o desenvolvimento de osteoartrite secundária.

Nos equinos a articulação mais acometida por esta doença é a tíbio-társica, sendo o ápice da crista intermédia da tíbia o local mais comum. Os sinais clínicos podem surgir antes do primeiro ano de vida do animal, mas em alguns casos só se tornam evidentes na fase inicial de treinamento. Outros animais, mesmo que desempenhando atividade atlética, permanecem assintomáticos por toda a vida.

Na rotina de atendimento de hospitais veterinários é comum o encaminhamento de animais portadores de osteocondrite dissecante para tratamento cirúrgico, mesmo que estes não apresentem sinal clínico da doença, sendo a indicação cirúrgica baseada apenas em achados radiográficos.

Como seu surgimento ocorre na fase de desenvolvimento dos animais, os estudos sobre esta doença envolvem, em sua maioria, animais muito jovens. Pouco se estudou sobre os animais com a doença já estabelecida, e muito menos sobre animais assintomáticos. Resta a dúvida, portanto, se nestes animais sem sinais clínicos existe um equilíbrio entre o fragmento osteocondral e a cavidade articular ou se, apesar da inexistência de manifestação clínica, ocorre degradação da matriz extracelular da cartilagem articular mesmo que em menor grau do que nos animais sintomáticos. Em outras palavras: será que existe necessidade de se operar animais sem sinais clínicos? E se sim, será que realmente estaríamos prevenindo o desenvolvimento de lesões degenerativas secundárias, ou apenas facilitando a comercialização desses animais?

Para obtermos as respostas a estes questionamentos, o presente trabalho foi realizado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARTICULAÇÕES DIARTRODIAIS

As articulações diartrodiais, ou sinoviais, permitem o movimento e transferem a carga entre os ossos. Estas articulações são constituídas pela superfície articular de pelo menos dois ossos, recoberta por cartilagem hialina, além de cápsula articular e ligamentos que envolvem e estabilizam a articulação. Esta cavidade é preenchida pelo líquido sinovial, que é o meio pelo qual os nutrientes alcançam a cartilagem articular (TODHUNTER, 1996). O conhecimento das principais estruturas das articulações sinoviais é fundamental para o melhor entendimento sobre o desenvolvimento das doenças articulares.

2.1.1 Líquido Sinovial

O líquido sinovial é um ultrafiltrado plasmático. A maioria de seus íons e moléculas está presente no plasma, com exceção do ácido hialurônico que está presente em altas concentrações no líquido sinovial. Proteínas de alto peso molecular geralmente não estão presentes no espaço intra-articular. O líquido sinovial é composto por células mononucleares onde sinoviócitos, monócitos e linfócitos constituem 90% do total. O restante das células são leucócitos polimorfonucleares. A concentração celular normal segundo Todhunter (1996) é inferior a 500 células nucleadas/ μl . Van Pelt (1974) considerou normal a concentração de 87 células/ mm^3 . Embora possa auxiliar na confirmação da existência de um processo patológico, a contagem total e diferencial de leucócitos não permite um diagnóstico preciso (VAN PELT, 1974).

A maior parte das moléculas com tamanho inferior a 10 kDa (pequenas) presentes no líquido sinovial transita livremente por simples difusão, sendo limitadas principalmente pelo espaço intercelular da membrana sinovial (McILWRAITH, 2001). A exceção ocorre no caso da glicose, cujo transporte para o meio intra-articular ocorre provavelmente por difusão facilitada (WASSERMAN; HALLFELZS; LUST, 1993).

A proteína do líquido sinovial é proveniente do plasma, mas cerca de 2% da origem de algumas proteínas firmemente ligadas ao ácido hialurônico é desconhecida. Concentrações abaixo de 2,5 g/dL são consideradas dentro do padrão de normalidade (KORENEK et al., 1992; TROTTER; McILWRAITH, 1996). McIlwraith (2001) acredita que estas proteínas possam ser oriundas dos sinoviócitos tipo B.

A característica viscosa do líquido sinovial é atribuída ao ácido hialurônico, um glicosaminoglicano linear que, ao contrário dos demais glicosaminoglicanos que são sintetizados no Complexo de Golgi, é sintetizado na face interna da membrana plasmática do sinoviócito e a cadeia nascente, à medida que é sintetizada, passa para o meio extracelular. A síntese é catalisada pelas hialuronam sintases (PHILIPSON; SCHWARTZ, 1984; PREHM, 1984).

Segundo Van Pelt (1967) o líquido sinovial da articulação tíbio-társica de equinos deve ter a coloração amarelo claro e aspecto translúcido, sem a presença de grumos. Ao avaliar a concentração de proteína total de articulações normais, o valor médio obtido foi de $1,37 \pm 0,09$ g/dL (com intervalo entre 0,83–2,17 g/dL). Nos casos de inflamação articular, o conteúdo de proteína total aumenta pelo aumento na permeabilidade vascular que acarreta na entrada de proteínas de maior peso molecular na cavidade articular (VAN PELT, 1974).

2.1.2 Cápsula Articular

A cápsula articular é composta por uma camada externa fibrosa e por uma interna denominada membrana sinovial. A camada fibrosa é rica em colágeno, principalmente do tipo I, e desempenha essencialmente a função de contenção, garantindo a estabilidade articular (McILWRAITH, 2001; CAOLA, 2003). Além das fibras de colágeno, esta camada é composta por uma rica rede vascular e por nervos sensoriais responsáveis pela condução de estímulos dolorosos e de pressão (CAOLA, 2003).

Entre as principais funções da membrana sinovial estão a atividade fagocítica e o controle do conteúdo de proteína e ácido hialurônico do líquido sinovial. Esta membrana atua como uma barreira permeável que controla a composição do líquido sinovial (McILWRAITH, 2001). Os danos à membrana

sinovial induzem a liberação de metaloproteinases, prostaglandinas, radicais livres e citocinas pelos sinoviócitos, alterando o ambiente articular (McILWRAITH, 2001).

A membrana sinovial é composta pela camada íntima que se justapõe à lâmina própria, constituída por tecido conjuntivo (TODHUNTER, 1996; McILWRAITH, 2001). Key¹ (apud IWANAGA et al., 2000, p. 17) classificou pela primeira vez este tecido em areolar, adiposo e fibroso. Esta classificação foi baseada no tipo de tecido conjuntivo encontrado abaixo da camada íntima celular da membrana. A membrana sinovial areolar é composta por uma camada íntima celular mais espessa com tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos. O tipo adiposo possui camada única de células achatadas com presença de células adiposas na camada subíntima. O terceiro e último tipo é o fibroso, que é composto por camada celular em contato direto com tecido conjuntivo denso. Jonhanssen e Rejnö (1976) identificaram estes três tipos teciduais na membrana sinovial de equinos, sendo o areolar o mais abundante.

Em algumas regiões, a membrana sinovial areolar apresenta superfície dobrada ou ondulada, que se insinuam para a cavidade articular, formando as chamadas "vilosidades sinoviais". Esta região, rica em elementos celulares e vasos sanguíneos, pode ser a responsável pela homeostase da cavidade articular por produzir líquido sinovial, remover resíduos sólidos intra-articulares, além de controlar eventos imunológicos (IWANAGA, 2000). Para Shively e Sickle (1977), este tipo de membrana sinovial rica em vilosidades coincide com áreas submetidas a menor estresse e maior abrasão nos equinos. Shirichi et al. (1999) afirmaram que os equinos, mais do que os demais mamíferos, possuem membrana sinovial amplamente recoberta por densa camada de vilosidades sinoviais.

A camada íntima tem espessura de um a três sinoviócitos, sem membrana basal. Embora ainda existam controvérsias quanto à classificação dos sinoviócitos, a existência de dois tipos celulares é amplamente aceita (IWANAGA et al., 2000). Nesta classificação os sinoviócitos são diferenciados em tipo A, morfologicamente similar a macrófagos e, tipo B, que se assemelha a fibroblastos (CAOLA, 2003).

¹ KEY, J. A. The synovial membrane of joints and bursae. In: COWDRY, E. V. **Special cytology**. Paul B. New York: Hoeber Inc., 1928.v. 1, p. 735-766.

Os sinoviócitos tipo A possuem forma circular e estão localizados na região superficial da camada íntima da membrana sinovial. Sua superfície é recoberta por microvilos típicos dos macrófagos (IWANAGA et al., 2000). Nas vilosidades sinoviais, a quantidade de sinoviócitos tipo A varia de acordo com a região do vilo, estando em maior número na porção superior (SHIKICHI et al., 1999). Fisiologicamente estas células são capazes de absorver e degradar constituintes extracelulares, restos celulares, microrganismos e antígenos do líquido sinovial por possuírem sistema vesicular e lisossomal bem desenvolvidos (IWANAGA et al., 2000).

Os sinoviócitos tipo B possuem grande núcleo e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e distribuído pelo citoplasma, sugerindo processo de síntese protéica ativo. A síntese de colágeno (FELL et al., 1976), fibronectina (MAPP; REVELL, 1985) e ácido hialurônico (CASTOR; CABRAL, 1989) pelos sinoviócitos tipo B já foi relatada. Ao contrário dos sinoviócitos tipo A, o número de vesículas e vacúolos é reduzido. Quando localizados na região mais profunda da camada íntima da membrana sinovial, os sinoviócitos tipo B apresentam uma extensão de processo apical, em direção à cavidade articular que se ramifica de forma dendrítica (IWANAGA et al., 2000). Sua distribuição ao longo da vilosidade sinovial é mais constante do que a dos sinoviócitos tipo A (SHIKICHI et al., 1999).

Jonhansson e Rejnö (1976) publicaram o primeiro estudo sobre membrana sinovial de equinos empregando tanto microscopia de luz como eletrônica. Foram analisadas membranas provenientes de articulações saudáveis, com fratura articular e com osteocondrose. Sinoviócitos tipo A foram menos encontrados que sinoviócitos tipo B nas articulações saudáveis. Nas articulações com OCD, houve aumento no número relativo dos sinoviócitos tipo A que, por sua vez, apresentaram aumento de vesículas citoplasmáticas. Outras alterações celulares encontradas nos casos de OCD foram hiperplasia e alongamento celular, dilatação em diferentes graus do retículo endoplasmático rugoso dos sinoviócitos tipo B, que em alguns casos evoluíram para formação de vesículas e perda de ribossomos. Estas alterações indicam aumento de atividade celular (JONHANSEN; REJNÖ, 1976).

As articulações com OCD apresentam processo inflamatório mais pronunciado do que as articulações com fratura articular, provavelmente por

apresentarem processo com maior tempo de evolução. Foi identificada a presença de edema, infiltração de células inflamatórias, hipertrofia das vilosidades sinoviais, aumento da vascularização e aumento das células sinoviais. O citoplasma destas células apresentou aumento no número de vacúolos. Eritrócitos fagocitados pelas células sinoviais e hemossiderose indicaram hemorragia recente e o potencial de fagocitose dos sinoviócitos (JONHANSEN; REJNÖ, 1976).

2.1.3 Cartilagem Articular

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo especializado, desprovido de vascularização e inervação, que recobre a superfície óssea das articulações diartrodiais. Este tecido atua distribuindo carga, absorvendo impacto, suportando forças de tensão e pressão e reduzindo atrito do movimento articular. Estas características estão diretamente relacionadas com a composição e a estrutura da matriz extracelular (MEC), que é composta principalmente por uma densa rede de fibras de colágeno e por agregados de proteoglicanos (PG) e ácido hialurônico, gerando uma matriz densa e muito hidratada. Os condrócitos são responsáveis pela síntese e pela manutenção da MEC (MARTEL-PELLETIER et al., 2008). A MEC mantém os condrócitos unidos e fornece uma via permeável para difusão de nutrientes, oxigênio e excreção celular (NELSON; COX, 2008).

Em peso seco, a cartilagem articular possui por volta de 50% de colágeno, 35% de proteoglicanos, 10% de glicoproteínas (proteínases e seus inibidores, fatores de crescimento, lisozima, fibronectina, condronectina e proteína oligomérica da matriz, entre outras), 3% de minerais e 1% de lipídeos. Os condrócitos correspondem a apenas 1 a 12% do volume da cartilagem (TODHUNTER, 1996).

O alto teor de água da cartilagem desempenha papel importante na manutenção da elasticidade e do sistema de nutrição e lubrificação. Sua distribuição pelo tecido ocorre de forma desigual, sendo que a maior concentração (80%) está situada próxima à superfície articular, decrescendo gradualmente e chegando a 65% nas camadas mais profundas do tecido. A manutenção e o fluxo de água pela MEC dependem da sua interação com as

macromoléculas que a compõem. A difusão de água pela cartilagem auxilia a movimentação de nutrientes do líquido sinovial para o tecido, contribuindo para a nutrição dos condrócitos (MARTEL-PELLETIER et al., 2008).

2.1.3.1 Macromoléculas da cartilagem articular

2.1.3.1.1 Colágeno

As fibrilas de colágeno formam uma rede que dá forma, resistência à tensão e firmeza à cartilagem articular. O principal tipo de colágeno da cartilagem é o tipo II, um colágeno fibrilar, que corresponde a 90-98% do colágeno total da cartilagem.

A molécula de colágeno tipo II é composta por três cadeias polipeptídicas idênticas, chamadas $\alpha 1(\text{II})$ e codificadas no gene COL2A1, que formam, na maior parte de sua extensão, uma estrutura em tripla hélice (Figura 1). Esta região tripla hélice, que tem a forma de um bastão rígido e é típica dos colágenos fibrilares, é resistente à degradação pela maioria das proteases, mas pode ser clivada pela ação das collagenases neutras, principalmente as metaloproteinases MMP1, MMP8 e MMP13. Os fragmentos provenientes desta quebra inicial podem, então, ser desnaturados e clivados pelas gelatinases (MMP2 e MMP9) (MARTEL-PELLETIER et al., 2008).

As fibrilas do colágeno tipo II se formam pela disposição escalonada das moléculas, gerando estruturas de grande resistência à tensão. O diâmetro das suas fibrilas varia de 20 nm, na região superficial, a 70-120 nm, na região mais profunda (MARTEL-PELLETIER et al., 2008).

Figura 1 - Ilustração representando as cadeias polipeptídicas $\alpha 1(\text{II})$ que formam a molécula de colágeno tipo II

Além do colágeno tipo II, outros tipos de colágeno também estão presentes: IX, X e XI. O colágeno tipo XI é formado por três cadeias polipeptídicas diferentes – $\alpha 1(XI)$, $\alpha 2(XI)$ e $\alpha 3(XI)$ – sendo que $\alpha 3(XI)$ é derivada do gene COL2A1, mas difere de $\alpha 1(II)$ por modificações pós-tradução. O colágeno tipo XI também é um colágeno fibrilar (MARTEL-PELLETIER et al., 2008).

O colágeno tipo IX é membro da família FACIT (*fibril associated collagen with interrupted triple helix*), cujas moléculas se associam com as fibrilas do colágeno tipo II (Figura 2). É formado por três cadeias polipeptídicas diferentes – $\alpha 1(IX)$, $\alpha 2(IX)$ e $\alpha 3(IX)$ – e a cadeia $\alpha 2(IX)$ é glicosilada com uma cadeia de condroitim sulfato no domínio NC₃ (*non-collagen*) (MARTEL-PELLETIER et al., 2008).

Figura 2 - Ilustração representando moléculas de colágeno tipo IX (laranja e vermelho) associadas a fibrilas de colágeno tipo II

O colágeno tipo X é homotrimérico com estrutura $[\alpha 1(X)]_3$, e pertence à família dos colágenos que formam redes (MARTEL-PELLETIER et al., 2008).

2.1.3.1.2 Proteoglicanos

Os proteoglicanos (PG) são macromoléculas formadas por um esqueleto proteico com cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) covalentemente ligadas. Os GAGs são heteropolissacarídeos lineares formados por unidades repetitivas

dissacarídicas, compostas por um resíduo de hexosamina (α -D-glucosamina, β -D-glucosamina ou β -D-galactosamina) ligado a um resíduo de açúcar não-nitrogenado (ácido β -D-glucurônico, α -L-idurônico ou β -D-galactose) por ligação O-glicosídica. Nos GAGs sulfatados, uma ou mais hidroxilas da hexosamina ou do açúcar não-nitrogenado está esterificada com sulfato (NELSON; COX, 2008).

Existem seis tipos principais de GAGs em mamíferos: condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), queratam sulfato (KS), heparam sulfato (HS), heparina (Hep) e ácido hialurônico (AH) (NELSON; COX, 2008) (AH, não ocorre nos tecidos na forma de PG e não é sulfatado).

Estes compostos diferenciam-se entre si pelo tipo de hexosamina, tipo de açúcar não-nitrogenado, tipo de ligações glicosídicas, posições e números de ésteres de sulfato e presença ou não de grupos sulfamino e acetil (Tabela 1) (VIEIRA, 2005).

GAG	Açúcar não-nitrogenado	Ligação glicosídica	Hexosamina	Ligação glicosídica	Sulfato(s)
Ácido hialurônico	Ácido β -D-glucurônico	β (1-3)	β -D-N-Acetilglucosamina	β (1-4)	–
Condroitim sulfato	Ácido β -D-glucurônico	β (1-3)	β -D-N-Acetilgalactosamina	β (1-4)	C4 ou C6 (Hx)
Dermatam sulfato	Ácido α -L-idurônico	α (1-3)	β -D-N-Acetilgalactosamina	β (1-4)	C4 (Hx)
	Ácido β -D-glucurônico	β (1-3)			
Queratam sulfato	B-D-Galactose	β (1-4)	β -D-N-Acetilglucosamina	β (1-3)	C6 (Hx) C6 (Gal)
Heparam sulfato	Ácido β -D-glucurônico	β (1-4)	α -D-N-Acetilglucosamina N-sulfato	α (1-4)	N2 e/ou C6 (Hx)
Heparina	Ácido α -L-idurônico	α (1-4)	α -D-Glucosamina N-sulfato	α (1-4)	N2 e C6 (Hx) C2 (AU)

Fonte: Vieira (2005).

Legenda: Hx, hexosamina; Gal, galactosamina; AU, ácido idurônico.

Quadro 1 - Composição dos dissacarídeos típicos dos glicosaminoglicanos e respectivas ligações glicosídicas

A combinação dos grupos sulfato com os grupos carboxilato dos resíduos de ácido urônico confere aos GAGs uma alta densidade de cargas negativas. Para minimizar as forças repulsivas entre os grupos carregados vizinhos, estas moléculas assumem, quando em solução, conformação estendida, formando uma hélice em forma de bastão onde os grupos carboxilato negativamente carregados ocorrem em lados alternados da hélice. Esta forma estendida confere também separação máxima entre os grupos sulfato carregados negativamente. O padrão característico das unidades sulfatadas e não-sulfatadas dos GAGs possibilita o reconhecimento específico por uma variedade de proteínas ligantes que se associam com estas moléculas (NELSON; COX, 2008).

Os principais GAGs da MEC da cartilagem são AH, CS e KS. DS também está presente, em menor proporção.

O AH foi isolado pela primeira vez a partir do humor vítreo bovino por Meyer e Palmer (1934), que identificaram em sua estrutura o ácido urônico e uma hexosamina. Duas décadas mais tarde, as unidades alternadas de ácido D-glucurônico e N-acetilglucosamina foram estabelecidas como a unidade dissacarídica do AH (LINKER; MEYER, 1954; WEISSMAN et al., 1954). Este GAG é sintetizado de forma peculiar, na membrana plasmática celular, sendo liberado diretamente na MEC (ROUGHLEY, 2006). As hialuronam sintases (HAS) são as enzimas que catalisam esta síntese. Três isoformas foram descritas – HAS1, HAS2 e HAS3 – com propriedades enzimáticas diferentes, sendo que as moléculas sintetizadas por HAS3 são menores (1×10^5 a 1×10^6 Da) do que as sintetizadas por HAS1 e HAS2 (2×10^5 a 2×10^6 Da). HAS2 é capaz de sintetizar moléculas muito grandes ($>2 \times 10^6$ Da) (ITANO et al., 1999).

O AH, assim como os demais GAGs, é muito solúvel em água. Dado seu elevado tamanho molecular, que pode chegar a 4×10^6 Da, forma soluções altamente viscosas e claras que agem como lubrificantes no líquido sinovial das articulações (SAARI et al., 1993; NELSON; COX, 2008). Na MEC da cartilagem e dos tendões contribui para elasticidade e resistência à tensão destes tecidos, como resultado das interações que apresenta com outros componentes da matriz (NELSON; COX, 2008), como veremos mais adiante.

O CS, cujo peso molecular é da ordem de 15 a 25 kDa em mamíferos, é formado por ácido β -D-glucurônico e β -D-N-acetilgalactosamina. A substituição por um grupo sulfato pode ocorrer tanto no C4 como no C6 da N-

acetilgalactosamina. Dependendo do tipo de unidade dissacarídica que predomina no polímero, 4 ou 6 sulfatada, o CS é chamado condroitim 4-sulfato ou condroitim 6-sulfato. Em geral os polímeros são híbridos e o padrão de sulfatação dos dissacarídeos que compõem as cadeias de CS não é uniforme, seguindo padrões específicos ao longo de toda sua extensão (MICHELACCI et al., 1979; PLATT, 1996).

O KS é formado por uma sequência repetitiva do dissacarídeo composto por galactose e N-acetilglucosamina, sulfatados em C6 da N-acetilgalactosamina e/ou da galactose, formando cadeias com peso molecular entre 8,5 e 20 kDa. (HASCALL; RIOLO, 1972; MICHELACCI et al., 1979).

Células de mamíferos podem produzir até 30 tipos de PGs com grande variedade de tamanhos, estruturas e funções, atribuídas em grande parte à heterogenicidade das cadeias de GAGs ligadas à proteína central (DUDHIA, 2005).

Os PGs podem ocorrer em grânulos citoplasmáticos, na superfície celular e na MEC. Estas moléculas podem agir como organizadoras teciduais e influenciar diversos tipos de atividades celulares, tais como ativação de fatores de crescimento, reconhecimento e adesão celulares (KJELLÉN; LINDAHL, 1991; NELSON; COX, 2008), além de exercerem importantes funções na MEC.

O PG predominante na cartilagem articular é o agregam, que é constituído por um esqueleto proteico ao qual estão covalentemente ligadas moléculas de CS, KS, além de oligossacarídeos N- e O-ligados (HEINEGÅRD; HASCALL, 1974; HARDINGHAM; EWINS; MUIR, 1976). O agregam é encontrado em forma de enormes agregados (SADJERA; HASCALL, 1969), compostos por vários monômeros de PG ligados de forma não-covalente a uma molécula de AH (Figura 3) (HASSELL; KIMURA; HASCALL, 1986).

Legenda: Esqueleto proteico: azul; Domínios globulares: círculos azuis; Cadeias de condroitim sulfato (CS): linhas vermelhas; Cadeias de queratam sulfato (KS): linhas verdes; proteína de ligação (*link protein*): círculos amarelos; Ácido Hialurônico (AH): linha grossa vermelha.

Figura 3 - Ilustração do agregado formado por moléculas de agregam (AG) ligadas a uma molécula de ácido hialurônico (AH)

Existe um predomínio de agregam na região pericelular (ou territorial) da MEC da cartilagem, enquanto na região interterritorial há um predomínio de colágeno e, portanto, dos PGs que se ligam às fibrilas de colágeno, como decorim e fibromodulim (Figura 4) (DUDHIA, 2005).

Fonte: Dudhia (2005). Tradução do autor.

Figura 4 - Esquema da localização de alguns componentes da MEC da cartilagem

O agregcan possui um domínio globular (G1) na extremidade amino-terminal de seu esqueleto proteico, que interage com AH formando agregados (KIANI et al., 2002). O tamanho destes agregados depende do tamanho da molécula de AH (HASCALL; HEINEGÅRD, 1974) e, devido à sua natureza polianiónica, retêm água e são os principais responsáveis pelas propriedades de resistência à pressão da cartilagem, ou seja, quando a cartilagem é submetida à pressão, a água se desloca, sendo atraída de volta quando a pressão diminui, causando mínima deformação e amortecendo o impacto sobre os ossos (SCOTT, 1992).

O esqueleto proteico do agregcan tem peso molecular aproximado de 230 kDa e é constituída por três domínios globulares, G1, G2 e G3, e dois domínios interglobulares, que compreendem um curto domínio interglobular entre G1 e G2 (IGD) e um longo domínio estendido, glicosilado com as cadeias de GAGs, ainda subdividido em três subdomínios: KS, CS1 e CS2 (Figura 5) (KNUDSON; KNUDSON, 2001; ROUGHLEY et al., 2006).

Figura 5 - Ilustração representando duas moléculas de agregam ligadas a uma molécula de ácido hialurônico. Note que a molécula menor foi quebrada, perdendo parte do domínio CS2 e o domínio G3

Conforme já mencionado, a extremidade N-terminal do esqueleto proteico é formada pelo domínio globular G1 que interage com o AH e com uma glicoproteína, denominada de proteína de ligação, que estabiliza a ligação entre o AH e o G1 (HEINEGÅRD; HASCALL, 1974; KIANI et al., 2002).

O domínio G2, apesar de ter homologia com G1, não agrega com AH, mas parece atuar na inibição da liberação do agregam (DUDHIA, 2005).

O domínio interglobular (IGD), localizado entre o G1 e G2, também é exclusivo da molécula de agregam e possui pontos susceptíveis à ação proteolítica que, durante o *turnover* fisiológico ou no processo de degradação articular patológica, resulta na perda de toda porção de ligação dos GAGs, que é liberada do tecido por difusão, levando a alterações nas propriedades viscoelásticas da cartilagem. Após a quebra do IGD, o domínio G1 e a proteína de ligação permanecem ligados à molécula de AH, competindo pelos locais de ligação com outras moléculas de PG recém-sintetizadas (DUDHIA, 2005; ROUGHLEY, 2006). Outros pontos do agregam também podem ser expostos à ação proteolítica extracelular, resultando no acúmulo de moléculas com comprimentos diversos (Figura 6) (ROUGHLEY, 2006).

Figura 6 - Ilustração representando moléculas de agrecam com comprimentos diversos ligadas ao ácido hialurônico

O domínio KS, adjacente ao domínio G2, contém 30 sítios de glicosilação com cadeias de KS, que são ligadas ao esqueleto proteico do agrecam por resíduos de serina em oligossacarídeos tipo O-ligado. A função deste domínio ainda não está totalmente esclarecida e pode estar relacionada com a distribuição tecidual do agrecam (KNUDSON; KNUDSON, 2001). Cadeias de KS também podem estar presentes nos domínios G1, IGD e G2 (ROUGHLEY, 2006).

O domínio CS é o maior da molécula de agrecam e contém cerca de 120 repetições do dipeptídeo serina-glicina. As cadeias de CS (aproximadamente 100) ligadas a este domínio contribuem para a principal função do agrecam como PG estrutural, que é a habilidade de reter grande quantidade de água na MEC. É esta propriedade que confere ao tecido a resistência à pressão (KNUDSON; KNUDSON, 2001; KIANI et al., 2002).

O domínio CS é subdividido em dois subdomínios, denominados CS1 e CS2. Sabe-se que, em seres humanos, a região do gene que codifica o domínio CS1 apresenta polimorfismo de tamanho, o que pode resultar em variação no grau de substituição do agrecam com CS. Isto sugere que as propriedades funcionais do agrecam podem variar entre indivíduos, e que pessoas com agrecam menor e menos glicosilado sejam mais propensas a degeneração prematura da cartilagem. Nestes casos a relação entre CS/KS na molécula de agrecam estaria diminuída precocemente (ROUGHLEY et al., 2006).

O domínio G3 tem afinidade e pode se ligar a outras proteínas da MEC (KIANI et al., 2002; DUDHIA, 2005).

Tanto a idade como os processos de doenças, mesmo que por vias diferentes, podem acarretar alterações na proporção das moléculas e tamanho

dos agregados de PG da cartilagem articular, influenciando a qualidade e o bom funcionamento do tecido (HARDINGHAM; MUIR, 1974).

Com a idade, a estrutura do agregam e de seus agregados sofre alterações causadas tanto por processos biossintéticos como degradativos, regulados por mecanismos celulares e extracelulares, relacionados a diferentes fatores como espécie, articulação, local da cartilagem, local na MEC e região topográfica na superfície articular (MICHELACCI et al., 1979; MICHELACCI; LAREDO; DIETRICH, 1981).

A ação da idade sobre a constituição do agregam da cartilagem articular de equinos foi avaliada por Platt, Bird e Bayliss (1998), que constataram um aumento na heterogeneidade das moléculas de agregam com a idade relacionada à clivagem proteolítica específica sobre a região C-terminal do esqueleto proteico. Com a redução da quantidade das cadeias de CS do agregam que sofreu clivagem proteolítica, ocorreu a redução do tamanho hidrodinâmico das moléculas, o que justificaria o aumento da quantidade relativa de AH, provavelmente para acomodar as moléculas de PG recém-sintetizadas (PLATT; BIRD; BAYLISS, 1998).

No homem, quando ocorrem processos de crescimento e ossificação na cartilagem, o condroitim sulfato é híbrido, contendo unidades dissacarídicas 4- e 6-sulfatadas no mesmo polímero. A proporção de dissacarídeo 4-sulfatado é tanto maior quanto mais próximo da região de crescimento e ossificação. Na superfície articular, o condroitim sulfato é quase que exclusivamente 6-sulfatado (MICHELACCI et al., 1979; MOURÃO; MICHELACCI; TOLEDO, 1979). Estas alterações de estrutura foram observadas durante o crescimento fisiológico (com a idade) e também em doenças em que processos de crescimento e ossificação voltam a ocorrer, como osteoartrite (MICHELACCI et al., 1979) e tumores, tanto benignos (encontromatose, MICHELACCI; LAREDO; DIETRICH, 1981) como malignos (condrossarcoma, MOURÃO; MICHELACCI; TOLEDO, 1979).

Outra mudança na estrutura do agregam que ocorre com processos de crescimento e ossificação (e também com a idade) é um aumento na concentração de KS (KAPLAN; MEYER, 1959; MOURÃO; MICHELACCI; TOLEDO, 1979; MICHELACCI; LAREDO; DIETRICH, 1981). Isso pode se dever a dois fatores: (1) quebra do esqueleto proteico do agregam, levando a um acúmulo de moléculas proporcionalmente mais "pobres" em CS (ROUGHLEY et al., 2006);

(2) aumento na taxa de glicosilação no domínio KS, com cadeias de KS (BARRY et al., 1995).

Muito importantes também são as alterações que acontecem na cartilagem em decorrência da degradação do agregam. As principais enzimas que agem sobre o agregam são as agrecanases (ou ADAMTS-4 E ADAMTS-5) e outras metaloproteinases (MMPs) (SZTROLOVICS et al., 1997). Embora existam múltiplos pontos de clivagem no esqueleto proteico do agregam, o ponto crítico de clivagem fica entre G1 e G2, liberando o domínio rico em GAGs, importante para as propriedades mecânicas da cartilagem. G1 permanece ligado à molécula de AH, impedindo a ligação de novas moléculas de agregam (ROUGHLEY, 2006; HUANG; WU, 2008).

A avaliação da composição e do tamanho dos PGs da cartilagem de suínos com e sem alteração articular foi realizada por Šimůnek e Muir (1972), que constataram redução no peso molecular dos PGs nos animais doentes. A diferença de peso molecular entre os grupos decorreu provavelmente de alterações sutis na estrutura da molécula, uma vez que a cartilagens de ambos os grupos apresentou a mesma composição química (ŠIMŮNEK; MUIR, 1972).

Outros PGs encontrados na cartilagem são decorim e biglicam, da família SLRPs (*Small Leucine Rich Protein*). O decorim e o biglicam são glicosilados com uma ou duas cadeias de CS/DS, respectivamente (PLATT; BIRD; BAYLISS, 1998). Muitos PGs da família SLRP regulam a fibrilogênese do colágeno, atuando tanto na determinação do diâmetro das fibrilas e no seu espaçamento como na adesão entre as camadas. Outras possíveis ações sobre o colágeno, atribuídas a estes PGs, são a participação na interação entre as fibrilas na MEC e o impedimento do acesso das collagenases ao local de clivagem nas fibrilas. Alguns membros dessa família, entretanto, não interagem com colágeno (ex., biglicam). A interação destes PGs com outras macromoléculas, tais como fibronectina, elastina e fatores de crescimento também foi reportada (ROUGHLEY, 2006).

2.1.3.1.3 Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem

A Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem (COMP) é uma glicoproteína pentamérica com cerca de 524 kDa, composta por subunidades

com cerca de 110 kDa, (MÖRGELIN et al., 1992). Sua estrutura primária é homóloga à da trombospondina que, entre outras funções, tem sido relacionada com as interações entre componentes da matriz extracelular e as células (OLDBERG et al., 1992).

As proteínas não-colágenas da MEC podem influenciar a disposição das demais moléculas da matriz, interferindo desta forma nas propriedades físicas do tecido. Por interagir diretamente com os condrócitos, elas podem transmitir informações sobre as propriedades da matriz, influenciando a função celular. Uma característica das proteínas em formato de buquê, como é o caso da COMP, é a sua capacidade de interagir com um ou mais componentes localizados tanto na superfície celular como na MEC (DI CESARE et al., 2002).

Mörgelin et al. (1992) extraíram a forma intacta da COMP de condrossarcoma de *Swarm* em ratos e descreveram sua estrutura pentamérica, na qual os monômeros permanecem unidos por um domínio globular (Figura 7). No mesmo ano Hedbom et al. (1992) descreveram um método para purificação da COMP a partir de cartilagem articular. Dois anos mais tarde, esta proteína também foi identificada em matriz extracelular de tendão (DI CESARE et al., 1994).

Fonte: Imagem adaptada de Mörgelin et al. (1992)

Figura 7 - Ilustração demonstrando a estrutura pentamérica da COMP com monômeros (verdes) unidos por um centro globular (roxo)

A análise da composição química da COMP a partir da cartilagem articular demonstrou altas concentrações dos aminoácidos ácido aspártico/asparagina e ácido glutâmico/glutamina, perfazendo 30% do total de resíduos. A presença de 25 resíduos/1000 de cisteína indicou a presença de ligações dissulfeto, e a ausência de hidroxiprolina descartou origem relacionada com colágeno. A COMP é glicosilada com oligossacarídeos N-ligados. A identificação dos monossacarídeos xilose, galactosamina e ácido glucurônico sugere que cada subunidade protéica possa ser, ainda, glicosilada com 3 a 4 cadeias de CS, com 14-15 unidades dissacarídicas cada (HEDBOM et al., 1992).

A localização da COMP na MEC parece ser influenciada por idade, atividade física e doença articular. Durante a fase fetal, a COMP foi localizada na região pericelular territorial da MEC, passando para predomínio na região territorial na fase adulta (DI CESARE et al., 2002). Em cortes histológicos provenientes de cartilagem articular de equinos, acúmulo de COMP foi identificado ao redor de áreas de cartilagem fibrosada ou fibrocartilagem, principalmente na região intracelular e na matriz próxima aos condrócitos das zonas superficial e média (MURRAY et al., 2001). Equinos submetidos a exercício de alta intensidade apresentaram distribuição interterritorial (ver Figura 4), enquanto os animais submetidos a exercícios mais brandos apresentaram distribuição territorial na matriz (MURRAY et al., 2001), sendo que animais submetidos a exercício intenso apresentaram menor quantidade de COMP do que os animais sem treinamento físico (SKIÖLDEBRAND et al., 2009).

Em estudo imuno-histoquímico em articulações de ratos, a COMP foi localizada na MEC de cartilagem, mas não na região de tecido ósseo compacto e das trabéculas, confirmando sua presença somente na cartilagem articular (HEDBOM et al, 1992).

Diferentes estudos confirmaram a interação da COMP com moléculas da MEC da cartilagem articular. A ligação da COMP com o agregam foi confirmada por Rosenberg et al. (1998) e Chen et al. (2007), que identificaram interações zinco-dependente entre o domínio C-terminal da COMP e um ou vários monômeros de colágeno tipos I e II e pró-colágenos I e II. A COMP, quando em formato pentamérico, catalisou a formação das fibrilas de colágeno, por promover a associação inicial das moléculas de colágeno, aumentando a taxa de fibrilogênese e organização das fibrilas (HALÁSZ et al., 2007). Skiöldebrand et

al. (2009) igualmente indicaram a atuação da COMP na fibrilogênese após relacionarem a presença de fibras de colágeno mais delgadas com a menor concentração de COMP na cartilagem articular de equinos em treinamento quando comparados a animais sem treinamento.

A interação da região do domínio globular da COMP com a glicoproteína fibronectina foi demonstrada por Di Cesare et al. (2002), que sugerem que esta interação contribua tanto para a deposição de matriz como para adesão celular.

Por interagir com diferentes moléculas, assim como com os condrócitos, Hedbom et al. (1992) e Di Cesare et al. (2002) acreditam que a COMP possa ser um bom sinalizador das propriedades e condições da matriz extracelular.

2.2 OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA

O processo de ossificação endocondral é o mecanismo responsável pelo crescimento ósseo longitudinal e pelo suporte das superfícies articulares pelo osso subcondral, ocorrendo de forma ativa e simultânea em diferentes pontos do organismo em desenvolvimento, como nas epífises, no disco epifisário (para promover o crescimento ósseo longitudinal) e nos centros secundários de ossificação, como ossos do carpo e tarso (HURTIG; POOL, 1996).

Durante o desenvolvimento fetal, os ossos longos possuem dois tipos de condrócitos com diferentes funções. O primeiro tipo migra para a extremidade óssea, forma a cartilagem articular e produz proteínas estruturais e matriz que conferem resistência a esta superfície. O segundo tipo coalesce no centro secundário de ossificação da epífise e participa do processo de ossificação. Estes condrócitos estão organizados em quatro zonas histologicamente distintas: descanso ou germinativa, proliferativa, hipertrófica e de calcificação (Figura 8) (JEFFCOTT, 1991; HURTIG; POOL, 1996; WATKINS, 1999).

Fonte: disponível em: <http://medsci.indiana.edu/histo/docs/enchond.htm>

Figura 8 - Esquema mostrando o processo de ossificação endocondral

Na zona de descanso ou germinativa, assim como na proliferativa, ocorre a replicação das células para reposição dos condrócitos da cartilagem em crescimento que seguiram o processo de diferenciação. As células produzem e secretam a matriz extracelular da cartilagem, constituída principalmente por proteoglicanos e colágeno tipo II, que conferem as propriedades mecânicas do tecido (JEFFCOTT, 1991; HURTIG; POOL, 1996).

Na zona hipertrófica, os condrócitos sofrem hipertrofia e formam colunas celulares ordenadas, envolvidas por quantidade de matriz extracelular que vão aumentando, em direção às zonas hipertrófica e de transição. Os constituintes da matriz nessa região, principalmente proteínas estruturais, combinam-se com íons fosfatos e cálcio, gerando os cristais de hidroxiapatita. Estes cristais são responsáveis pela calcificação da cartilagem hipertrófica em crescimento. Na zona de calcificação, os condrócitos morrem e novos vasos sanguíneos,

provenientes da circulação metafisária, invadem as colunas deixadas pelos condrócitos enquanto estas se alongam, criando penínsulas de cartilagem calcificada revestidas por endóstio e vasos sanguíneos (HURTIG; POOL, 1996; WATKINS, 1999).

Em seguida, osteoblastos provenientes das células da medula óssea depositam osteóide na superfície das colunas com cartilagem calcificada, formando o tecido esponjoso primário. Este é reabsorvido e remodelado diversas vezes por influência de sinais biomecânicos, e é substituído por tecido esponjoso secundário, com ausência de cartilagem remanescente (HURTIG; POOL, 1996; WATKINS, 1999).

2.3 OSTEOCONDROSE

A osteocondrose (OC) faz parte do grupo de doenças ortopédicas do desenvolvimento (DOD) e é resultante de falha no processo de ossificação endocondral da cartilagem do complexo articular-epifisário ou do disco epifisário de crescimento (McILWRAITH, 1998). Nos equinos, a articulação mais acometida pela OC é a tíbio-társica, seguida pelas articulações fêmuro-patelar, escápulo-umeral e metacarpo/metatarso-falangeana (HARRISON; EDWARDS, 1996). Apesar do desenvolvimento da OC ocorrer durante o primeiro ano de vida de cavalos, o diagnóstico muitas vezes é feito somente após o aparecimento dos sinais clínicos, desencadeados pelo início do treinamento em animais atletas (GØNDAHL, 1991).

A lesão primária da OC ocorre durante a fase de diferenciação e maturação do processo de ossificação, quando as células e a matriz extracelular são substituídas por tecido ósseo (JEFFCOTT, 1991). A alteração deste processo ocorre geralmente na zona hipertrófica da cartilagem, onde a mineralização e a invasão dos vasos sanguíneos na matriz cartilaginosa são impedidas, ocasionando espessamento localizado da cartilagem, desarranjo das colunas de condrócitos e necrose da camada basal (DOUGLAS, 1992). Estas lesões podem regredir espontaneamente ou progredir, tornando-se clinicamente evidentes após sobrecarga biomecânica sobre a região afetada (WATKINS, 1999).

Carlson, Hilley e Meuten (1989) sugerem que as lesões na OC iniciam-se pela degeneração dos vasos sanguíneos. Esses autores realizaram uma análise morfológica do complexo articular epifisário de suínos com três meses de idade e encontraram, exclusivamente na região epifisária, canais cartilaginosos contendo vasos sanguíneos com células endoteliais em diferentes estágios de degeneração e necrose. Próximo a vasos com degeneração moderada, os canais cartilaginosos apresentavam cartilagem normal, enquanto as áreas de cartilagem necrosada estavam sempre próximas de células endoteliais também necrosadas, sugerindo que a degeneração dos vasos precede a morte dos condrócitos.

Lesões semelhantes foram observadas em equinos de até 18 meses de idade (CARLSON; CULLINS; MEUTEN, 1995). Com o objetivo de verificar até que idade persistem os canais cartilaginosos e, portanto, a possibilidade de surgimento de OC, Carlson, Cullins e Meuten (1995) e Shingeton et al. (1997) verificaram que vasos sanguíneos não mais existem nesses canais aos sete meses de idade. Portanto, se o surgimento de lesões típicas de OC for precedido de necrose do endotélio dos canais cartilaginosos, é provável que novas lesões de OC não ocorram a partir desta idade.

Dick, Enzerink e Van Weeren (1999) confirmaram estes resultados após avaliarem, por exame radiológico mensal do primeiro ao décimo primeiro mês de vida, as articulações tíbio-társica e fêmuro-patelar de potros pré-dispostos ao desenvolvimento da OC. Os autores concluíram que muitas lesões osteocondrais presentes no primeiro exame regrediram, e que a idade limite para esta regressão é cinco meses para a articulação tíbio-társica, e oito meses para a fêmuro-patelar. Após este período, as lesões existentes não regrediram mais e não houve surgimento de novas.

Apesar de não se saber exatamente o que desencadeia a doença, a contribuição de alguns fatores o desenvolvimento das lesões já está bem estabelecida (McILWRAITH, 1993b), levando à idéia de etiologia multifatorial, envolvendo fatores nutricionais (excesso de ingestão energética e desequilíbrio mineral), endócrinos, genéticos e biomecânicos (como trauma articular repetido) (GLADE, 1987; NAKANO; AHERNE, 1988; PHILLIPSON, 1990; SHOUGAARD; RONNE; PHILLIPSON, 1990; GØDAHL; DOLVIK, 1993; HURTIG; POOL, 1996; McILWRAITH, 1993b; PHILIPSSON et al., 1993; CARLSON; CULLINS; MEUTEN, 1995; EASTER; WATKINS, 1999). Assim como em outras espécies, equinos

maiores e com crescimento rápido são mais acometidos do que os demais (PHILIPSSON, 1996).

A OC pode acometer a cartilagem do complexo articular-epifisário de duas formas distintas. A manifestação mais comum é a osteocondrite dissecante (OCD), onde a margem da cartilagem articular é retida e sofre fratura (*flap*), com possível comprometimento do osso subcondral. Outro possível tipo de lesão articular é a formação de cistos cartilaginosos no osso subcondral, onde a cartilagem espessada e necrosada sofre invaginação (DOUGLAS, 1992; WATKINS, 1999).

2.4 OSTEOCONDRITE DISSECANTE

A osteocondrite dissecante (OCD) é a manifestação de OC resultante do surgimento de fissuras e eventual liberação de fragmentos na cavidade articular. Estes fragmentos podem acarretar inflamação articular, evoluindo muitas vezes para um quadro de osteoartrite (OA) secundária (McILWRAITH; NIXON, 1996).

Nos equinos, a articulação tíbio-társica é a mais acometida pela OCD, sendo o aspecto dorsal da crista intermédia da tíbia o mais frequentemente envolvido. A alteração primária característica é uma fissura que separa o ápice da crista intermédia da tíbia do osso subjacente, resultando em um fragmento osteocondral livre no espaço articular ou aderido ao osso (McILWRAITH, 1993a; HARRISON; EDWARDS, 1996).

A crista troclear lateral do talus é o segundo local mais acometido pela OC nesta articulação. As lesões variam desde um achatamento sutil até a separação completa de um fragmento osteocondral, que pode aumentar de tamanho assumindo a forma arredondada (HARRISON; EDWARDS, 1996). Outros locais acometidos, embora com menor frequência, são o maléolo medial da tíbia e a crista troclear medial do talus (McILWRAITH, 1993a; HARRISON; EDWARDS, 1996).

A exposição do osso subcondral à cavidade articular e a presença de fragmentos condrais e osteocondrais livres na articulação age como fator irritante, causando efusão sinovial, dor e claudicação. Douglas (1992) mostrou

que, em equinos, estes fragmentos separados frequentemente se ossificam, tornando-se visíveis ao exame radiográfico.

Os equinos portadores de OCD na articulação tíbio-társica podem não apresentar claudicação. Nos animais jovens, a efusão sinovial sem claudicação é o achado mais frequente (WATKINS, 1999). Maior período em decúbito e enrijecimento articular, levando a limitação de movimento e dificuldade em acompanhar os demais potros do piquete, também são sinais que podem ocorrer (JEFFCOTT, 1991; JEFFCOTT, 1996).

Claudicação e efusão da articulação acometida podem estar associadas com o início do treinamento, sugerindo a influência biomecânica e a ativação de lesões silenciosas. Nos casos onde o estresse biomecânico e o trauma ocorrem em excesso, o animal pode apresentar claudicação mais evidente e/ou queda de desempenho (JEFFCOTT, 1991; JEFFCOTT, 1996).

Na maioria das vezes, a análise do líquido sinovial de articulações acometidas com OC apresenta valores dentro do padrão de normalidade. Ocasionalmente, após o exercício, podem ser observados sinais não-específicos de inflamação branda (EASTER; WATKINS, 1999).

O diagnóstico é feito quando os sinais clínicos anteriormente citados são acompanhados por alterações radiográficas nos locais anatômicos predispostos ao desenvolvimento da OCD (WATKINS, 1999). O achado radiográfico mais comum na OCD na crista intermédia da tíbia é a presença de fragmento ósseo próximo à superfície osteocondral. A projeção radiográfica dorsomedial-plantarolateral oblíqua é a que permite melhor visualização dos fragmentos situados na crista intermédia da tíbia (GØNDAHL, 1991; HOPE, 1984; McILWRAITH, 1993a). As lesões de OCD em animais assintomáticos são diagnosticadas, muitas vezes, durante exame radiográfico de rotina ou para comercialização.

Hope (1984) relacionou as alterações radiográficas com os sinais clínicos e achados cirúrgicos de equinos com OCD nas articulações tíbio-társica e fêmuro-patelar. Lesões bilaterais foram encontradas em mais de 50% dos casos. Para classificação das lesões, o autor criou graus 0-5, com base na gravidade (0=ausência de defeito articular ou fragmento; 5=múltiplos defeitos e fragmentos). Houve boa correlação entre o grau da lesão no exame radiográfico e o achado cirúrgico ou de necropsia. O sinal clínico mais comum foi efusão

articular, que foi mais prevalente nas lesões nos graus 3-5. Claudicação foi o segundo sinal clínico mais comum. Em alguns casos, fragmentos articulares maiores foram subestimados pelo exame radiográfico. O autor acredita que isso se deva à calcificação parcial destes fragmentos e/ou à projeção radiográfica inadequada.

A associação da radiografia com a ultrassonografia no diagnóstico das enfermidades ortopédicas pode fornecer mais informações do que quando estas técnicas são utilizadas separadamente (REDDING, 2001a). O exame ultrassonográfico é indicado quando existe a suspeita de OCD, mas o exame radiográfico foi inconclusivo, e quando há interesse em se observar de forma detalhada e imediata a condição dos tecidos moles da articulação e da cartilagem articular (REDDING, 2001b).

Em estudo prospectivo, Relave et al. (2009) compararam a utilização do exame ultrassonográfico com o radiográfico para o diagnóstico de lesões osteocondrais na articulação tíbio-társica de equinos e concluíram que apesar do exame ultrassonográfico apresentar maior sensibilidade, por detectar lesões ainda não mineralizadas, ele possui algumas limitações como permitir somente a avaliação superficial da articulação, depender da eficiência do operador em manipular o aparelho e ser uma técnica de diagnóstico em tempo real.

Easter e Watkins (1999) acreditam que os achados radiográficos podem subestimar a gravidade da lesão e citam a vantagem da artroscopia como ferramenta adicional para a avaliação da articulação, com a obtenção de um prognóstico mais fidedigno.

O tratamento cirúrgico tem sido o de eleição e consiste na remoção do fragmento osteocondral e curetagem da superfície óssea subcondral alterada. Com o avanço das técnicas e dos equipamentos, a artrotomia foi substituída pela artroscopia para o tratamento da OCD por propiciar redução do trauma aos tecidos moles, encurtar o período de recuperação e diminuir a ocorrência de complicações, além de oferecer resultados cosméticos e funcionais superiores (WATKINS, 1999). McIlwraith (1984) descreveu a técnica de artroscopia na articulação tíbio-társica de equinos e alguns anos após McIlwraith, Foerner e Davis (1991) consagraram a técnica para o tratamento de OCD nesta articulação ao relatarem alta taxa de sucesso após operar 318 articulações.

McIlwraith (1993a) e Jørgensen et al. (1997) indicaram o tratamento cirúrgico quando sinais clínicos da doença estão presentes, ressaltando que alguns cavalos tiveram carreira atlética mesmo com lesões confirmadas durante exame radiográfico. Brehm e Staecker (1999) em estudo retrospectivo realizado na Alemanha também não encontraram diferença nos resultados da carreira atlética de cavalos trotadores com e sem OCD na articulação tíbio-társica. McIlwraith (1993a) presumiu que a ausência de sinais clínicos pode ser um indicativo de equilíbrio entre o fragmento e a superfície óssea adjacente. Entretanto, nos casos com claudicação ou efusão articular, mesmo em animais não-atletas, o tratamento cirúrgico é indicado.

O desenvolvimento secundário de doença articular degenerativa é a maior complicação dos casos de OCD. Felizmente esta evolução não ocorre nos casos diagnosticados e tratados no início da doença (WATKINS, 1999). Contudo, em casos acompanhados com efusão articular, claudicação e presença de fragmentos osteocondrais livres pode haver espessamento de cápsula articular, acentuado desgaste de cartilagem e sinovite proliferativa, o que altera o prognóstico e sugere reflexão sobre o valor e o uso do animal.

2.5 BIOMARCADORES

A cartilagem articular está em processo contínuo de remodelamento e reparo, nos quais várias moléculas da MEC são removidas e substituídas. Durante este processo, diferentes macromoléculas (ou fragmentos delas) são liberadas no líquido sinovial e/ou no plasma (SKIÖLDEBRAND et al., 2009).

Muitas destas macromoléculas poderiam atuar como biomarcadores, e sua mensuração pode auxiliar no melhor entendimento dos processos patofisiológicos das doenças articulares, identificar articulações doentes, avaliar o grau de degradação da cartilagem articular, monitorar a resposta à terapia, além de possibilitar um prognóstico (FRISBIE et al., 2008).

Entre os biomarcadores diretos do metabolismo da cartilagem estão os glicosaminoglicanos e a proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP - McILWRAITH, 2005).

2.5.1 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos

A análise dos GAGs da cartilagem, do líquido sinovial e do sangue tem sido realizada em seres humanos e em animais portadores de doenças articulares, e entre elas a OCD, com o intuito de se correlacionar a estrutura e a renovação (*turnover*) destas moléculas com o surgimento e a progressão da doença.

No início da década de 1980, iniciaram estudos para se avaliar a concentração de AH no líquido sinovial de articulações saudáveis e doentes de equinos. Rowley, Antonas e Hilbert (1982) avaliaram a concentração de AH no líquido sinovial de animais saudáveis e obtiveram valor médio de 127 mg/100 ml. Dois anos mais tarde, os mesmos autores observaram redução significativa na concentração de AH no líquido sinovial de articulações doentes ($0,58 \pm 0,16$ g/L) quando comparadas com articulações saudáveis ($1,26 \pm 0,26$ g/L) (HILBERT; ROWLEY; ANTONAS, 1984). O método de dosagem baseia-se na degradação enzimática com hialuronidase microbiana, que é específica para AH, seguida de quantificação dos hexa e tetrassacarídeos formados por método colorimétrico (oxidação com periodato e reação com ácido tiobarbitúrico, gerando cromóforo).

Popot et al. (2004) avaliaram a concentração plasmática de AH em cavalos de diferentes idades logo após o exercício, utilizando um *kit* para ELISA, e obtiveram um valor médio de 89 ng/ml (15–322 ng/ml). Cavalos mais velhos apresentaram uma tendência em relação a valores mais altos. No líquido sinovial, utilizando um *kit* destinado a fluidos biológicos humanos, a concentração média obtida foi de 328 ± 112 µg/ml. Utilizando o método de ELISA, Taylor et al. (2006) também obtiveram grande variação na concentração de AH no líquido sinovial de articulações normais (4,3–436,86 µg/ml, com valor médio 140 µg/ml). Animais com doença articular apresentaram redução no valor médio obtido (83,4 µg/ml), porém sem diferença significativa.

O método de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) foi utilizado por Tulamo, Heiskanen e Salonen (1994) para comparar a concentração e o peso molecular do AH no líquido sinovial de articulações normais com o líquido sinovial de articulações com artrite traumática aguda e crônica, artrite séptica e doença articular degenerativa. O peso molecular das articulações controle ($2,5 \times 10^6$) não variou de forma significativa das articulações

com artrite traumática aguda e crônica (2×10^6). A maior diferença foi obtida no peso molecular do AH proveniente de articulações com artrite séptica (1 a $1,5 \times 10^6$). A concentração de AH nas articulações controle ($0,33 \pm 0,12$ g/L) foi maior de forma significativa somente nos casos de artrite séptica ($0,07 \pm 0,03$ g/L) e em articulações com sinais radiográficos de doença articular degenerativa ($0,12 \pm 0,01$ g/L).

A quantificação de AH e GAGs sulfatados no líquido sinovial de articulações saudáveis e com OA pelo método de precipitação por azul de alcian foi avaliada por Little et al. (1990). Apesar de ter a vantagem de ser um teste rápido, algumas amostras tiveram valor negativo para GAGs sulfatados. Além disso, os valores obtidos para AH e GAGs sulfatados foram semelhantes para articulações saudáveis e doentes e não se correlacionaram com as demais variáveis mensuradas, colocando em dúvida a viabilidade deste método. Michelacci, Glashan e Schor (1989) demonstraram que o método de precipitação de GAGs por azul de alcian sofre influência de íons e de ácidos nucleicos.

Frisbie et al. (2008) avaliaram a concentração do epítipo CS846, como marcador da síntese de agregam, e a de GAG, pelo método de reação com azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB) modificado, como marcador de degradação da MEC, no sangue e líquido sinovial de equinos submetidos a exercício com e sem OA induzida. Houve aumento da concentração sérica e no líquido sinovial em relação às mensurações iniciais de ambos os marcadores, tanto nos animais somente exercitados como nos exercitados com OA associada. Este aumento, entretanto, foi maior de forma significativa, em todos os momentos, nos animais com OA. Utilizando este mesmo método, Alwan et al. (1991) obtiveram aumento na concentração de GAGs no líquido sinovial, plasma e urina em equinos com osteoartrite, o que provavelmente reflete a perda de proteoglicanos pela cartilagem articular durante o processo da doença. Já Skiöldebrand et al. (2001) relataram redução na concentração de agregam no líquido sinovial de animais com OA moderada.

O método de DMB também foi utilizado, combinado com uso de enzimas específicas, por Palmer, Bertone e McClain (1995) para mensurar GAGs sulfatados no líquido sinovial e no sangue, e CS e KS no líquido sinovial de equinos saudáveis e com doença articular com diferentes graus de severidade. Foi observado aumento gradativo na concentração de CS no líquido sinovial de

animais com doença articular aguda ou crônica de grau leve a severo, em relação ao grupo controle, confirmando que o CS é o principal contribuinte para o aumento da concentração total de GAGs sulfatados nos casos com doença articular. O aumento do CS em casos brandos de OA, ainda sem sinais de sinovite ou alterações radiográficas, reforça sua utilidade para o diagnóstico precoce da doença. Já a elevação na concentração de KS somente nos casos crônicos pode estar relacionada com uma MEC mais degradada, uma vez que o aumento na concentração de CS é observado em fases anteriores da doença (PALMER; BERTONE; McCLAIN, 1995). Ao contrário do que foi observado por Frisbie et al. (2008), os autores não encontraram boa correlação entre a concentração sérica e do líquido sinovial de GAGs sulfatados em animais sãos e doentes (PALMER; BERTONE; McCLAIN, 1995).

Uma desvantagem do método de DMB é que ele não permite a avaliação individual dos GAGs. Quando utilizado para mensurar a concentração de GAGs na urina, o resultado sofre interferência de outros componentes urinários, tais como pigmentos e sais presentes em maiores concentrações. Nestes casos, a extração e a quantificação de GAGs urinários pelos métodos de cromatografia de troca iônica e eletroforese em gel de agarose é mais indicada, mesmo sendo mais trabalhosa e demorada, pois permite identificação e quantificação dos GAGs separadamente, eliminando a interferência de outros componentes urinários (LIMA; BACCARIN; MICHELACCI, 2007).

Embora a determinação de GAGs urinários esteja ganhando importância na literatura e existam evidências de que a maioria dos GAGs presentes na urina sejam de origem sistêmica e filtrados nos rins, o mecanismo exato da excreção urinária de GAGs ainda não está estabelecido (VIEIRA et al., 2005).

Em ratos (MICHELACCI et al., 2001), gatos (PEREIRA et al., 2004), equinos (VIEIRA et al., 2005) e seres humanos (COHEN; MOURÃO; DIETRICH, 1977) os principais GAGs urinários são CS, DS e HS, com traços de KS. Visto que a cartilagem é o tecido animal que contém a maior concentração de CS e KS, é provável que esses GAGs urinários sejam, pelo menos em parte, provenientes da cartilagem. Portanto a análise qualitativa, quantitativa e estrutural destes componentes pode ser útil para o diagnóstico e o acompanhamento de doenças articulares em equinos (VIEIRA et al., 2005).

Utilizando o método de cromatografia de troca iônica e eletroforese em gel de agarose, Vieira et al. (2005) compararam a quantidade de GAGs excretados na urina por equinos sedentários, atletas e com OA de diferentes idades e observaram redução na excreção de CS, DS, e HS e um aumento na concentração de KS com a idade. Os atletas excretaram quantidade inferior de GAGs (incluindo KS) quando comparados a animais da mesma idade e sedentários. O aumento da excreção de KS por animais sedentários com OA sugere perda de PG de camadas mais profundas da cartilagem, enquanto que o aumento da excreção de CS, mas não de KS, por cavalos atletas com OA sugere a perda de PGs ricos em CS, provavelmente de camadas mais superficiais da cartilagem articular (VIEIRA et al., 2005).

Alegando a escassez de estudos sobre OCD em equinos na fase em que comumente os sinais clínicos se tornam aparentes (a partir dos 24 meses), Grauw et al. (2006) avaliaram a concentração dos GAGs no líquido sinovial de equinos portadores de OCD na crista intermédia da tíbia com idade entre 24 e 48 meses por meio do método colorimétrico com DMB. Como não foi obtida diferença significativa entre os níveis de GAGs no líquido sinovial de animais com e sem OCD, os autores acreditam que pode haver uma estabilização na degradação destas moléculas em equinos com OCD com idade entre 24 e 48 meses.

Em cortes histológicos de fragmentos osteocondrais de seres humanos (KOCH; KAMPEN; LAPRELL, 1997) e de equinos com idades entre 16 e 24 meses portadores de OCD (LILLICH et al., 1997), a avaliação da presença de PGs com a coloração com azul de toluidina evidenciou redução na intensidade da coloração, indicando uma redução na quantidade de PG na cartilagem articular. Em estudo imuno-histoquímico dos cortes para CS e KS foi observada redução significativa na quantidade de CS, sem redução significativa de KS (LILLICH et al., 1997). Para os autores, este resultado pode indicar uma via catabólica seletiva do condrócito, que poderia causar alterações na matriz da cartilagem, tornando-a mais susceptível ao trauma.

Ao extrair e mensurar a concentração de GAGs totais, CS e KS na cartilagem de fragmentos osteocondrais de animais com OC e idades entre 8 e 18 meses, pelo método de DMB, Bertone et al. (2005) relataram diminuição não-significativa na concentração total de GAGs dos animais portadores de OC

quando comparados ao grupo controle. Já a concentração de KS foi significativamente maior, de forma significativa, nos animais com OC.

2.5.2 Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem (COMP)

Por ser um componente da MEC desempenhando papel na manutenção da integridade da cartilagem articular, diversos estudos relacionaram a concentração da COMP no líquido sinovial e sangue com a presença e gravidade das doenças articulares, tanto no homem como em equinos. Mesmo estando presente em outros tecidos como tendões e membrana sinovial, a presença da COMP na cartilagem articular é mais marcante, fazendo com que sua variação sanguínea seja um bom indicativo de alterações na cartilagem (ANDERSSON et al., 2006).

No início da década de 1990, Saxne et al. (1992, 1993) e Forslind et al. (1992) fizeram os primeiros relatos sobre a utilização da mensuração da COMP no líquido sinovial e no sangue como marcador de doenças articulares humanas, como nos casos de artrites e artrite reumatóide. Entretanto, como a atividade física acarreta aumento sérico transitório da COMP, é indicado que a colheita de material para quantificação desta proteína como marcador de doença articular seja realizada após no mínimo 30 minutos de repouso (NEIDHART et al., 2000; ANDERSSON et al., 2006).

Lohmander, Saxne e Heinegård (1994) avaliaram a concentração da COMP no líquido sinovial e no sangue de pacientes com OA primária e traumática, e detectaram aumento da COMP logo após a injúria. Apesar de apresentar decréscimo, os valores permaneceram elevados por um longo período após a lesão. O aumento da COMP sérica na OA apresentou boa correlação com a gravidade das lesões (CLARK et al., 1999).

A avaliação seriada da COMP sérica em pacientes portadores de artrite reumatóide também foi sugerida como indicador de prognóstico ou com a finalidade de se avaliar a progressão das lesões (SKOUMAL; KOLARZ; KLINGER, 2003).

O aumento da COMP no líquido sinovial de pacientes com doença articular encontrado em diferentes estudos decorre provavelmente tanto da degradação

da MEC como do aumento da síntese pelos condrócitos, talvez numa tentativa de reparar o tecido lesado (LOHMANDER; SAXNE; HEINEGÅRD, 1994). Este aumento é acompanhado de aumento na concentração de fragmentos da COMP com 50-70 kDa nas articulações doentes (NEIDHART et al., 1997). Este é, portanto, um indício de degradação da COMP. Para a confirmação do aumento de síntese e *clearance* da COMP em articulações doentes, a análise quantitativa do líquido sinovial deve ser acompanhada de análise qualitativa para avaliar o grau de fragmentação das moléculas (ARAI et al., 2008).

Misumi et al. (2001, 2002) foram os primeiros a avaliar a presença da COMP no líquido sinovial e no sangue de equinos, com e sem alteração articular, empregando anticorpo monoclonal anti-COMP humana. Ao contrário do que foi encontrado no homem, a concentração de COMP obtida foi inferior, tanto no líquido sinovial como no plasma dos animais com enfermidade articular (OA, OCD, fratura articular, sinovite e artrite séptica). Esta redução na concentração de COMP talvez tenha ocorrido porque o anticorpo utilizado possui maior afinidade por epítomos presentes somente nas moléculas maiores, que não sofreram fragmentação. Como nas doenças articulares ocorre maior degradação da molécula da COMP, as moléculas íntegras estão em menor número.

Redução na concentração de COMP no líquido sinovial de equinos com OA também foi observada tanto por Skiöldebrand et al. (2001) e por Taylor et al. (2006), ao utilizarem anticorpo policlonal anti-COMP bovina.

Um anticorpo monoclonal anti-COMP equina, que reconhece tanto as moléculas de COMP não-degradadas e oligoméricas como as monoméricas e menores, foi desenvolvido por Arai et al. (2005). Utilizando este anticorpo na mensuração de COMP no líquido sinovial de equinos sãos e com enfermidade articular, foi observado um aumento significativo de COMP no segundo grupo (animais saudáveis: $133,1 \pm 31,5$ µg/ml; animais com OA: $205,8 \pm 90,9$ µg/ml), como observado no homem. Cerca de 97% dos fragmentos de COMP detectados no líquido sinovial de equinos saudáveis apresentaram tamanho igual ou superior a 290 kDa, e 3,3% apresentaram tamanho intermediário entre 220 e 110 kDa. Nos equinos com OA, houve redução na porcentagem de fragmentos maiores (85%) e aumento de fragmentos com tamanho intermediário (14%). Fragmentos ainda menores, com tamanhos entre 95 e 35 kDa, não observados

em animais saudáveis, foram detectados no líquido sinovial de articulações doentes.

Outro método para se avaliar a degradação articular é a mensuração da COMP na urina. Este trabalho foi realizado por Misumi et al. (2006), que identificaram moléculas de COMP na urina de cavalos portadores de afecções articulares, incluindo OC, com peso molecular semelhante ao encontrado no líquido sinovial em trabalhos anteriores (60, 100 e 150 kDa), indicando que depois de atingirem a circulação, estas moléculas não sofrem mais degradação e se concentram na urina. Assim como no líquido sinovial, houve aumento na concentração urinária de COMP nos animais com doença articular ($1,02 \pm 0,75$ $\mu\text{g}/100$ mg creatinina) quando comparados a animais livres da doença ($0,57 \pm 0,29$ $\mu\text{g}/100$ mg creatinina). Os autores também observaram uma correlação entre a concentração urinária de COMP e a concentração de metaloproteinases 2 e 9 no líquido sinovial, sugerindo uma degradação enzimática da COMP no líquido sinovial antes de chegar à circulação sanguínea e linfática. Arai et al. (2008) também observaram correlação positiva entre a presença de osteófitos e estágios mais avançados de OA com a concentração urinária de COMP em equinos e, no ano seguinte, o mesmo grupo confirmou o aumento da COMP sérica em equinos com OA quando comparados a animais saudáveis (YAMANOKUCHI et al., 2009), validando a mensuração da COMP como marcador de doença articular em equinos.

Assim como Neidhart et al. (2000) e Andersson et al. (2006) para o homem, Helal et al. (2007) identificaram aumento na concentração sérica de COMP em equinos 1 e 5 horas após atividade física, com retorno aos valores basais em 24 horas. Como os animais utilizados não possuíam histórico ou sinal clínico de alterações articulares, é provável que este aumento seja causado pelo catabolismo e *clearance* articular em resposta ao esforço e ao aumento do fluxo sanguíneo sinovial decorrente do exercício (HELAL et al., 2007).

3 JUSTIFICATIVA

Grande parte dos estudos sobre OCD em equinos está voltada para animais que apresentam a fase inicial do desenvolvimento da doença. Segundo Grauw et al. (2006), pouco se sabe sobre o metabolismo da cartilagem em animais com lesões de OCD já estabelecidas. O fato da lesão de OCD na articulação tíbio-társica se estabilizar radiograficamente antes do primeiro ano de idade, enquanto os sinais clínicos normalmente se tornam evidentes quando os animais iniciam a vida atlética, levanta as seguintes questões: será que articulações acometidas permanecem metabolicamente alteradas mesmo sendo radiograficamente estáveis? E será que estas alterações contribuem para a manifestação clínica da doença?

Outro fator relevante é a frequente indicação cirúrgica com base em achados radiográficos, após solicitação de exame de verificação da integridade ósteo-articular de equinos comercializados e, particularmente, daqueles pré-selecionados para exposições, leilões ou exportação. A busca de tratamento baseado em correção de imagens radiográficas, nos casos de OCD e de tantas outras enfermidades, é vício comum em nosso meio, e não apenas em nosso país. Será que nestes animais a degradação da cartilagem articular é semelhante a dos animais com sinais clínicos da doença, indicando a necessidade da cirurgia?

4 OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi comparar animais com idade superior a 12 meses portadores sintomáticos ou assintomáticos de OCD na articulação tíbio-társica com animais livres da doença, e considerar a real necessidade da realização do tratamento cirúrgico em animais assintomáticos.

Para cumprir este objetivo, neste trabalho foi necessário:

- Avaliar a apresentação clínica desses animais por meio do exame físico e radiográfico, assim como as características físico-químicas e a celularidade do líquido sinovial.
- Analisar os GAGs no fragmento osteocondral, líquido sinovial e urina, e comparar os resultados com os valores de animais sadios.
- Identificar e analisar a fragmentação da COMP no líquido sinovial de animais sãos e com OCD.
- Analisar a morfologia dos fragmentos osteocondrais de animais com OCD e da membrana sinovial em animais sãos e doentes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Este foi um estudo prospectivo onde animais portadores de OCD na crista intermédia da tíbia atendidos e operados no Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário – FMVZ – USP, no período entre abril de 2006 e abril de 2009, foram comparados com animais livres da doença. Para tanto, estes animais foram divididos em três grupos distintos:

- Grupo I – animais saudáveis: foram utilizados sete equinos da raça Mangalarga, machos, com idade entre 2 e 4 anos, com peso corporal médio de 290 kg e clinicamente sadios. Estes animais não apresentavam histórico de lesões na articulação tíbio-társica, não demonstravam claudicação ao passo ou trote, e não responderam positivamente ao teste de flexão dos membros pélvicos. Destes 7 animais, 5 foram submetidos a artroscopia das articulações tíbio-társicas direita e esquerda para colheita de material, totalizando 10 articulações, além da colheita de urina. Os dois animais restantes foram utilizados somente para colheita de urina.
- Grupo II – com OCD assintomática: 11 articulações de 8 animais, sendo 3 com OCD bilateral assintomática e 3 com OCD unilateral assintomática. Dois animais apresentaram OCD bilateral, com uma delas assintomática, perfazendo um total de 11 articulações (Quadro 2).
- Grupo III – com OCD e sintomatologia: 25 articulações, de 16 animais, sendo 9 animais com OCD e sintomatologia bilateral e 5 animais com OCD e sintomatologia unilateral. Dois animais apresentaram OCD bilateral, mas com sintomatologia em apenas um dos lados (Quadro 3).

A presença ou ausência de sinais clínicos de OCD foi determinada durante o exame de claudicação padrão (Anexo A), realizado pelo Serviço de Clínica Médica de Equinos ou pelo Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário – FMVZ – USP em todos os animais com histórico de claudicação ou encaminhados ao hospital para realização de artroscopia.

Foram considerados sintomáticos os animais que apresentaram efusão e/ou claudicação na articulação com OCD durante o exame de claudicação, além de fragmento osteocondral na crista intermédia da tíbia identificado durante

exame radiográfico. Os animais considerados assintomáticos foram aqueles que não apresentaram alterações no exame de claudicação, tendo a presença de fragmento osteocondral na crista intermédia da tíbia identificada durante exame radiográfico realizado previamente à internação, visando comercialização ou início de treinamento do animal.

ANIMAL	ARTICULAÇÃO	RAÇA	IDADE (ANOS)	SEXO	MEMBRO	PESO
E17	GII-1	BH	2	M	E	470
E18	GII-2	MM	3	M	D	300
E18	GII-3	MM	3	M	E	300
E19	GII-4	PSL	2	M	D	435
E19	GII-5	PSL	2	M	E	435
E20	GII-6	PSL	6	M	D	460
E20	GII-7	PSL	6	M	E	460
E21	GII-8	PSL	5	M	E	517
E22	GII-9	PSL	4	M	D	480
E15	GII-10	BH	2	F	E	460
E16	GII-11	PSL	4	M	D	430

Legenda: BH, brasileiro de hipismo; MM, mangalarga marchador; PSL, puro sangue lusitano; M, macho; F, fêmea; D, direito; E, esquerdo.

Quadro 2 - Articulações com OCD assintomáticas (GII) - São Paulo - 2006/2009

ANIMAL	ARTICULAÇÃO	RAÇA	IDADE (ANOS)	SEXO	PESO	MEMBRO	CLAUD.	EFUSÃO
E1	GIII-1	PSL	2,7	M	420	D	P	P
E1	GIII-2	PSL	2,7	M	420	E	P	P
E2	GIII-3	Campolina	2,5	M	450	D	P	P
E2	GIII-4	Campolina	2,5	M	450	E	P	P
E3	GIII-5	BH	3,5	F	400	D	A	P
E3	GIII-6	BH	3,5	F	400	E	A	P
E4	GIII-7	BH	2	M	436	D	P	P
E4	GIII-8	BH	2	M	436	E	A	P
E5	GIII-9	PSA	11	M	285	D	P	P
E6	GIII-10	PSL	3	M	406	D	P	P
E6	GIII-11	PSL	3	M	406	E	P	P
E7	GIII-12	BH	7	F	470	D	P	P
E7	GIII-13	BH	7	F	470	E	P	P
E8	GIII-14	Campolina	1,2	F	331	D	P	P
E8	GIII-15	Campolina	1,2	F	331	E	P	P
E9	GIII-16	BH	8	F	520	D	P	P
E9	GIII-17	BH	8	F	520	E	P	P
E10	GIII-18	BH	8	M	619	D	P	P
E11	GIII-19	BH	2	M	500	D	A	P
E11	GIII-20	BH	2	M	500	E	A	P
E12	GIII-21	MM	12,6	M	395	E	P	P
E13	GIII-22	PSL	3,6	M	516	D	P	A
E14	GIII-23	PSL	3	M	450	E	P	P
E15	GIII-24	BH	2	F	460	D	A	P
E16	GIII-25	PSL	4	M	430	E	A	P

Legenda: PSL, puro sangue lusitano; BH, brasileiro de hipismo; PSA, puro sangue árabe; MM, mangalarga marchador; M, macho; F, fêmea; Claud., claudicação; D, direito; E, esquerdo; P, presente; A, ausente.

Quadro 3 - Articulações com OCD sintomáticas (GIII) - São Paulo - 2006/2009

5.2 EXAME RADIOGRÁFICO

O exame radiográfico das articulações tíbio-társicas incluiu as projeções ântero-posterior, látero-lateral, dorsomedial-plantarolateral e dorsolateral-plantaromedial, e foi realizado em todos os animais dos Grupos I, II e III.

Foram incluídos nos Grupos II e III os animais que, com sintomatologia clínica ou não, apresentaram fragmento osteocondral na crista intermédia da

tíbia ao exame radiográfico (Figura 9), e no Grupo I os que não apresentaram alterações radiográficas.

Figura 9 - Ilustração radiográfica em projeção dorsomedial-plantarolateral do fragmento osteocondral proveniente da crista intermédia da tíbia (seta branca) - São Paulo - 2006/2009

5.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E ARTROSCÓPICO

Após jejum alimentar prévio de 12 horas e hídrico de 6 horas, os animais foram submetidos à anestesia geral, com uso do seguinte protocolo anestésico: medicação pré-anestésica com cloridrato de xilazina 10%¹ na dose de 1,0 mg/kg por via intravenosa (IV); indução com associação de diazepam² (0,05 mg/kg IV) e quetamina 10%³ (2 mg/kg IV) e manutenção com isoflurano⁴ vaporizado em oxigênio a 100%. A tricotomia da região do tarso foi realizada imediatamente antes da sedação.

No centro cirúrgico, os animais dos Grupos I, II e III foram posicionados em decúbito dorsal, com o membro a ser operado flexionado. A antisepsia foi

¹ Sedazine – Fort Dodge, Iowa, EUA

² Compaz – Cristália, Itapira, Brasil

³ Dopalen – Vetbrands, Paulínea, Brasil

⁴ Isoforine – Cristália, Itapira, Brasil

realizada com solução degermante de clorexidina, seguida de solução alcoólica de clorexidina, essa última efetuada pelo cirurgião. Após a montagem do campo operatório, foi realizada artrocentese com agulha 40x10 mm no recesso dorso-medial da articulação, próximo aos tendões dos músculos tibial cranial e fibular terceiro. Nesse momento foi realizada a colheita de líquido sinovial para análise. Na sequência, utilizando-se uma seringa de 20 ml, a cavidade articular foi distendida com solução de Ringer com lactato, em volume entre 60 e 100 ml, na dependência do porte físico e capacidade volumétrica da articulação. Com uso de lâmina de bisturi nº 15, foi realizada incisão de pele, tecido subcutâneo e cápsula articular no centro do recesso dorso-medial distendido. A cânula artroscópica com obturador rombo foi introduzida na articulação, em seguida o obturador foi removido e o artroscópio⁵ (4 mm de diâmetro e lente de 30º) posicionado e travado junto à cânula, visualizando-se a cavidade articular. Para criação do portal de acesso ao instrumental, uma agulha 40x10 mm foi posicionada no recesso dorso-lateral distendido da articulação, lateral ao tendão do músculo extensor digital longo. Uma vez determinado o local mais adequado de acesso, foi realizada incisão de pele, tecido subcutâneo e cápsula. A pinça de biópsia foi introduzida por este portal para colheita de fragmentos de membrana sinovial.

Nos animais dos Grupos II e III foram introduzidos instrumentais específicos para retirada do fragmento osteocondral e curetagem da borda da lesão, quando necessário (Figura 10). A articulação permaneceu distendida com solução de Ringer com lactato, em temperatura ambiente, até o término do procedimento. Pontos em X (Sultan) com fio de náilon 2-0 foram utilizados para a sutura da pele.

⁵ Modelo Hopkins 11, Karl Storz® - Endoscope: H. Strattner & Cia. Ltda – Rio de Janeiro, Brasil

Figura 10 - Ilustração artroscópica de fragmento osteocondral na crista intermédia da tíbia (A), remoção do fragmento (B), mesmo local depois da retirada do fragmento (C) e curetagem (D) - São Paulo - 2006/2009

O antibiótico empregado no período pós-operatório foi amicacina⁶ na dose de 15 mg/kg IV, uma vez ao dia, por três dias, e como terapia anti-inflamatória e analgésica foi administrada fenilbutazona⁷ na dose de 4,4 mg/kg IV, uma vez ao dia por três dias. A ferida foi mantida com penso protetor e os curativos foram realizados a cada troca com líquido de Dakin, até a retirada dos pontos de sutura, o que ocorreu por volta do 10º dia pós-operatório.

5.4 COLHEITA DE MATERIAL

5.4.1 Urina

Após posicionamento dos animais dos Grupos I, II e III na mesa cirúrgica, a vesícula urinária foi sondada. Os primeiros 20 ml de urina foram desprezados e, em seguida, duas alíquotas de 60 ml foram colhidas e armazenadas à temperatura de -20°C até o momento da análise.

A amostra de urina de dois animais do Grupo I que não foram submetidos a artroscopia foi colhida com os animais em estação, após sedação com

⁶ Sulfato de Amicacina – Nova Farma, Anápolis, Brasil

⁷ Equipalazone – marcolab, Duque de Caxias, Brasil

acepromazina 1%⁸. Após a exposição do pênis, a vesícula urinária foi sondada e o material colhido. Estas amostras foram utilizadas para identificação e quantificação de CS, DS, HS e KS urinários.

5.4.2 Líquido Sinovial

A artrocentese e a colheita do líquido sinovial foram realizadas nas articulações dos animais dos Grupos I, II e III que foram submetidas à artroscopia, antes do início da infusão intra-articular da solução de Ringer com lactato.

Uma fração de líquido sinovial foi encaminhada para citologia e dosagem de proteína total. O restante foi submetido à centrifugação⁹ refrigerada a 4°C (10000 x g) por 30 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -80°C até o momento da análise. Estas amostras foram utilizadas para identificação e quantificação dos GAGs e para identificação e análise da fragmentação da COMP no líquido sinovial.

5.4.3 Membrana Sinovial

No início da artroscopia, foram colhidos dois fragmentos de membrana sinovial da porção proximal da bolsa articular lateral dos animais dos três grupos com auxílio de pinça de biópsia (Figura 11).

A fixação destes fragmentos foi realizada em formol 10%. Após fixação, todos os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina.

⁸ Acepran 1% - Univet, São Paulo, Brasil

⁹ Eppendorf 5417R – Eppendorf, Hamburg, Alemanha

Figura 11 - Ilustração artroscópica da colheita de fragmentos de membrana sinovial. (A) aspecto geral da membrana sinovial; (B) colheita do material com auxílio de pinça de biópsia - São Paulo - 2006/2009

5.4.4 Fragmento osteocondral

Os fragmentos osteocondrais provenientes da crista intermédia da tíbia dos animais dos Grupos II e III foram removidos com o auxílio de uma pinça artroscópica. Posteriormente estes fragmentos foram classificados de acordo com o tamanho em seu maior eixo em: grau 1: < 4mm; grau 2: entre 4 e 8mm; grau 3: > 8mm; e grau 4: múltiplos fragmentos. Esta classificação foi adaptada a partir de graduação para fragmentos osteocondrais localizados na articulação tíbio-társica de equinos com OCD identificados durante exame radiológico desenvolvida por Hoppe (1984).

Em seguida, os fragmentos foram fixados em Metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) e álcool 99,3%, descalcificados em ácido fórmico a 20% e incluídos em blocos de parafina.

5.5 ANÁLISE DO MATERIAL

A análise citológica e a dosagem de proteína total das amostras de líquido sinovial foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

A extração, identificação e quantificação dos GAGs urinários e do líquido sinovial foram realizadas nos Laboratórios da Disciplina de Biologia Molecular do

Departamento de Bioquímica da UNIFESP. A análise da COMP no líquido sinovial foi realizada no mesmo laboratório.

No Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia na FMVZ/USP foi realizada a análise histológica da membrana sinovial e fragmento osteocondral.

5.5.1 Análise física do líquido sinovial

O líquido sinovial foi analisado quanto à coloração, sendo classificado como amarelo palha, amarelo ouro e avermelhado; e quanto ao aspecto, como límpido, semi-turvo e turvo, recebendo escores de 1 a 3 para cada característica analisada. A característica de viscosidade foi dividida em < 2 cm, entre 2 e 5 cm e > 5 cm.

5.5.2 Contagem global e diferencial das células do líquido sinovial

Para a contagem total de células nucleadas, amostras contendo 1,0 ml de líquido sinovial colhido das articulações dos Grupos I, II e III foram centrifugadas durante 10 minutos a 2000 x g e o sedimento foi ressuspenso em 1,0 ml de PBS (solução salina tamponada com fosfato), para contagem global de células em câmara de Neubauer.

Em seguida foram confeccionados os esfregaços, corados com Metanol-May Grunwald-Giemsa, para a contagem diferencial dos leucócitos.

5.5.3 Dosagem da proteína total do líquido sinovial

Para a dosagem 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 pelo método do biureto, com a utilização do analisador bioquímico automático¹⁰.

5.5.4 Extração dos GAGs urinários e do líquido sinovial

Os GAGs das amostras de urina (40 ml) foram extraídos por cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose *Fast Flow*¹¹ (5 ml *bed volume*, 1x5 cm). Cada amostra foi filtrada, diluída com 3 volumes de água destilada e aplicada à coluna previamente equilibrada com água destilada.

A coluna foi lavada com 20 ml NaCl 0,3 M, e os GAGs foram eluídos com 10 ml de NaCl 2 M. A fração proveniente da eluição foi precipitada pela adição lenta e sob agitação de três volumes de metanol. Após 24 horas a -20°C, o precipitado formado foi coletado por centrifugação (3000xg, por 15 min.) e seco a vácuo. As amostras de urina foram ressuspensas em 100 µl de água destilada.

Para extração dos GAGs do líquido sinovial, 100 µl de cada amostra foram incubados com 200 µl de maxatase¹² (4 mg/ml em Tris-HCl 0,05 M), *overnight*, a 50°C. Em seguida, as amostras foram fervidas por 15 minutos e os resíduos insolúveis foram removidos por centrifugação. O sobrenadante foi seco a vácuo e ressuspenso em 50 µl de água destilada.

5.5.5 Identificação dos GAGs urinários e do líquido sinovial

Alíquotas (5 µl) das soluções de GAGs urinários e do líquido sinovial foram submetidas à eletroforese em gel de agarose¹³ (0,055%) com tampão 1,3-diaminopropano¹⁴-acetato 0,05 M, pH 9,0 (PDA), conforme metodologia descrita por Jaques et al. (1968) e modificada por Dietrich e Dietrich (1976).

O tampão PDA discrimina, por ordem decrescente de mobilidade eletroforética, CS, DS e HS. KS tem migração semelhante à do CS ou do DS, dependendo do seu grau de sulfatação. Hep migra como HS.

¹⁰ Modelo Labmax 240 – Labtest, Tokyo, Japão

¹¹ Q-Sepharose *Fast Flow* – Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Suécia

¹² Maxatase – Biocon Brasil Industrial, Rio de Janeiro, Brasil

¹³ Agarose (Standard Low-Mr) – Bio Rad Laboratories Ltd., Richmond, EUA

¹⁴ 1,3-diaminopropano – Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, EUA

No líquido sinovial foram identificados CS e AH, que migra na forma um arraste não-metacromático (azul). A banda de AH desaparece completamente após degradação com hialuronidase bovina¹⁵.

Após a eletroforese, os GAGs foram fixados no gel por cetavlon¹⁶ 0,1%. Após 2 horas de fixação (no mínimo), o gel foi seco sob corrente de ar quente.

As lâminas de GAGs urinários foram coradas com azul de toluidina¹⁷ 0,1% em solução de ácido acético 1% em etanol 50%. O excesso de corante foi removido pela mesma solução de ácido acético 1% em etanol 50%.

As lâminas de GAGs do líquido sinovial foram coradas com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M, pH 5,0. O excesso de corante foi removido pela mesma solução de acetato de sódio 0,025 M, pH 5,0.

A quantificação dos GAGs urinários e do líquido sinovial foi realizada por densitometria¹⁸ dos géis corados e secos.

5.5.6 Detecção do queratam sulfato (KS) urinário e do líquido sinovial por *immunoblotting*

Como a concentração urinária e no líquido sinovial de KS é inferior ao limite de detecção do método de eletroforese, esse composto foi detectado por *immunoblotting*, utilizando o anticorpo monoclonal MST1¹⁹ que reconhece tanto proteoglicanos de queratam sulfato como cadeias livres desse GAG (ALVES et al., 1994). Para o *immunoblotting* do KS urinário, foi utilizada uma alíquota (5 µl) dos GAGs extraídos por cromatografia de troca iônica da urina dos cavalos dos Grupos I, II e III. Para identificação do KS nas amostras de líquido sinovial das articulações dos Grupos I, II e II foram utilizados 5 µl de líquido sinovial puro.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose e, após a corrida, os GAGs foram transferidos para membrana de nitrocelulose²⁰ e de

¹⁵ Hyaluronidase Type I-S: From Bovine Testes – Sigma Aldrich, St Louis, EUA

¹⁶ N,N-metilbisacrilamida, brometo de cetiltrimetilamônio - Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, EUA

¹⁷ Azul de toluidina – Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA

¹⁸ Densitômetro Shimadzu modelo CS-9000 – Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão

²⁰ Anticorpo monoclonal MST1 – produzido pelo Laboratório do Departamento de Bioquímica UNIFESP, São Paulo, Brasil

²⁰ Membrana de Nitrocelulose - Bio Rad Laboratories Ltd., Richmond, EUA

nylon²¹, por capilaridade. Após cerca de 1:30 hs, a membrana de nitrocelulose foi mergulhada em solução de caseína (Leite Molico 5%) em solução de salina tamponada com Tris (*Tris Buffered Saline*, TBS). Decorridas 2 horas à temperatura ambiente, a membrana foi lavada três vezes rapidamente e uma vez por 5 minutos com TBS e, em seguida, mergulhada por 2 horas em solução contendo anticorpo primário (MST1).

A membrana foi lavada de acordo com protocolo de lavagem padrão com TBS contendo Tween 20²² 0,05% (TBST, três lavagens rápidas e três lavagens de 5 minutos cada, sob agitação) e TBS (3 lavagens de 5 minutos cada, sob agitação). Em seguida foi incubada com anticorpo secundário (anti-Ig de camundongo²³) complexado com biotina diluído 1:5000 em solução 1% de soroalbumina bovina²⁴ (BSA) em TBS. Após 1:30 hs à temperatura ambiente, a membrana foi submetida a lavagem padrão e incubada por 1 hora com o complexo streptavidina-peroxidase²⁵ diluído 1:5000 em solução 1% de BSA em TBS. Após nova lavagem padrão, a membrana foi revelada com substrato quimioluminescente contendo luminol (Immobilon Western HRP^{®26}). Este método permite detecção, mas não quantificação de compostos.

5.5.7 Preparação da COMP da cartilagem articular

A obtenção do antígeno COMP equino foi realizada em nosso laboratório pelo método descrito por Smith et al. (1997) e Misumi et al. (2001), com modificações. Foram colhidos 25 g de cartilagem da superfície articular de dois fêmures provenientes de um equino eutanasiado no Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário – FMVZ/USP, em decorrência de enfermidade gastrointestinal. A cartilagem foi pulverizada em nitrogênio líquido, para a obtenção de fragmentos muito pequenos, o que aumenta a eficiência da extração. O procedimento está esquematizado na figura 12.

²¹ Membrana de Nylon – Zeta Probe - Bio Rad Laboratories Ltd., Richmond, EUA

²² Tween 20 – USB Corporation, Cleveland, EUA

²³ Anti-mouse Ig, Biotinylated Species-specific whole antibody (from sheep) – Amersham - GE Health Care, Little Chalfont, Reino Unido

²⁴ Soaroalbumina bovina (fração V) – Sheikagaku Kogyo Co. Ltda., Tóquio, Japão

²⁵ ECL Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate - GE Health Care, Little Chalfont, Reino Unido

²⁶ Immobilon Western HRP – Millipore Corporation, Billerica, EUA

Figura 12 - Esquema do processo de preparação de COMP a partir de cartilagem articular equina - São Paulo - 2006/2009

O hidrocloreto de guanidina (GuHCl) é um agente caotrópico, que quebra as ligações fracas entre os componentes macromoleculares da matriz extracelular, mas não quebra ligações covalentes. A incubação da cartilagem com solução de GuHCl 4 M dissocia os agregados e solubiliza os PGs e demais proteínas solúveis da matriz. Inibidores de proteases impedem a ação de metaloproteinases e proteases lisossomais endógenas. O processo foi repetido para aumentar a eficiência da extração. Esta eficiência foi avaliada por proteólise dos fragmentos que restaram após a extração e análise de GAGs nesses fragmentos. Mais de 90% dos PGs foram extraídos.

Os componentes solubilizados pela GuHCl foram precipitados por etanol (3,5 volumes). Moléculas pequenas, sais e GuHCl permaneceram no sobrenadante.

O precipitado foi ressuspenso em uréia 7 M (30 ml) e a COMP foi purificada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose²⁷. Uma coluna de 1,25x8 cm (40 ml, *bed volume*) foi montada e equilibrada em uréia 7 M em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8. A amostra foi aplicada à coluna a um fluxo de 0,8 ml por minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com 100 ml de uréia 7 M em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8, e eluída com gradiente linear de NaCl 0 a 1 M, na mesma solução. Foram colhidas 160 frações de 3 ml.

O conteúdo de proteína das frações foi avaliado pela absorbância a 280 nm, e os proteoglicanos e GAGs foram quantificados pela reação com DMB.

Frações alternadas foram analisadas por *dot blotting* e as que apresentaram bandas de alto peso molecular foram analisadas por *Western blotting*, e reveladas com anticorpo anti-COMP equino. Alíquotas de uma a cada cinco frações foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em gradiente de 4-16%. Foram transferidas para membrana de nitrocelulose e reveladas com anticorpo primário anti-COMP eqüina. As frações contendo COMP foram combinadas, e esta preparação passou a ser utilizada como padrão para detecção e dosagem de COMP.

²⁷ DEAE-Sepharose – Bio Rad Laboratores, Richmond, EUA

5.5.8 Detecção da COMP por *immunoblotting*

Para o *immunoblotting* da COMP do líquido sinovial, amostras das articulações dos três grupos foram pré-tratadas com hialuronidase bovina²⁸ conforme protocolo descrito por Neidhart et al. (1997) com algumas modificações. Alíquotas contendo 100 µl de líquido sinovial foram incubadas com 10 µl hialuronidase bovina por 2 horas a 30 °C. Em seguida as amostras foram secas à vácuo e ressuspensas com 20 µl de água destilada.

As amostras de líquido sinovial (10 µl) foram submetidas a SDS-PAGE (4 a 16%), em condições redutoras. Após a corrida, a COMP foi transferida para membrana de nitrocelulose por corrente elétrica. Após cerca de 50 minutos, a membrana de nitrocelulose foi mergulhada em solução de caseína (Leite Molico 5%) em solução de salina tamponada com Tris (TBS) por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, a membrana foi lavada três vezes rapidamente com TBST e, em seguida, mergulhada por 1 hora à temperatura ambiente em solução de BSA 2% em TBST contendo anticorpo monoclonal 14G4 na diluição 1:3000.

A membrana foi lavada de acordo com protocolo de lavagem padrão com TBS contendo Tween 20 0,05% (TBST, três lavagens rápidas e três lavagens de 5 minutos cada, sob agitação), seguida por uma lavagem rápida com TBS. Em seguida foi incubada com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) complexado com peroxidase²⁹ diluído 1:4000 em solução de BSA 2% em TBST. Após 1 hora à temperatura ambiente, protegida de luz, a membrana foi submetida a lavagem padrão e revelada com substrato quimioluminescente contendo luminol (Immobilon Western HRP®). Este método permite detecção, mas não quantificação de compostos.

²⁸ Hyaluronidase Type I-S: From Bovine Testes – Sigma Aldrich, St Louis, EUA

²⁹ Goat anti mouse IgG-HRP, 12-349 – Millipore Upstate, Billerica, EUA

5.5.9 Dosagem de creatinina

A dosagem de creatinina das amostras de urina foi realizada pelo método de picrato alcalino³⁰. A absorbância foi lida a 510 nm em espectrofotômetro³¹.

5.5.10 Análise histológica dos tecidos

5.5.10.1 Membrana sinovial

Cortes de 5 μ m de membrana sinovial fixada em formol 10% foram obtidos em micrótomo. Estes foram corados pela hematoxilina e eosina para exame e descrição das alterações histopatológicas.

A presença de vilos sinoviais foi classificada como discreta, moderada e intensa. A proliferação de sinoviócitos foi considerada sempre que maior concentração celular e estratificação das camadas foram observadas.

5.5.10.2 Fragmento Osteocondral

Após classificação de acordo com o seu tamanho, os fragmentos foram fixados, descalcificados e incluídos em blocos de parafina. Posteriormente estes fragmentos foram seccionados por micrótomo (5 μ m) e corados por azul de toluidina para avaliação da presença de PGs e pela hematoxilina e eosina para exame e descrição das alterações histopatológicas.

A cartilagem articular dos fragmentos foi avaliada quanto à presença de fibrilação, fibrose e eburnação (ausência de cartilagem e exposição do osso subcondral). A proliferação de condrócitos também foi avaliada.

³⁰ Creatinina Colorimétrica – CELM, Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, São Paulo, Brasil

³¹ Spectrophotometer U-2000 – Hitachi, Tokyo, Japão

5.5.11 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos, para comparação entre os grupos, foi realizada com auxílio de programa computacional Minitab versão 15, sendo aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, seguido de análise de Kruskal-Wallis e teste de Dunn. O nível de significância adotado foi 5%.

6 RESULTADOS

6.1 ANIMAIS

No Grupo II (animais com OCD, mas assintomáticos), a média de idade dos animais foi $3,5 \pm 1,6$ anos. O peso corporal médio dos animais foi $431,5 \pm 69$ kg. No Grupo III (sintomáticos), a idade média foi $4,3 \pm 3,1$ anos, e o peso corporal médio foi $440,8 \pm 69$ kg. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos II e III tanto para o peso corporal como para a idade dos animais. Houve predomínio de animais da raça BH e PSL tanto no Grupo II (87,5%) como no Grupo III (80%).

Em ambos os grupos, o número de machos com OCD foi superior ao de fêmeas, sendo que no Grupo II, dos oito animais com OCD assintomática, sete eram machos (87,5%) e um era fêmea (12,5%). No Grupo III, dos 16 animais com OCD sintomática, onze eram machos (68,8%) e cinco eram fêmeas (32,2%).

A distribuição das articulações acometidas por OCD nos dois grupos foi muito semelhante. Das 11 articulações com OCD do Grupo II, cinco eram do membro posterior direito e seis do membro posterior esquerdo. No Grupo III, das 25 articulações avaliadas, 13 eram do membro posterior direito e 12 do membro posterior esquerdo.

Houve uma predominância de animais com OCD bilateral em ambos os grupos. Dos oito animais do Grupo II, três (37,5%) apresentaram OCD assintomática bilateral e três (37,5%) a forma unilateral. Dois animais (25%) apresentaram OCD bilateral, mas assintomática em apenas um dos membros. No grupo III, dos 16 animais sintomáticos para OCD, nove (56,3%) apresentaram a doença em ambas as articulações, cinco (31,2%) apresentaram a doença em somente uma articulação e dois (12,5%) apresentaram OCD bilateral, mas com sintomatologia em apenas um dos membros (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição das formas de OCD unilateral e bilateral entre os Grupos II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

Dos sinais clínicos apresentados pelas 25 articulações do Grupo III, efusão articular esteve presente em 24 articulações (96%) e claudicação foi observada em 18 articulações (72%). Os dois sintomas estiveram presentes, de forma concomitante, em 17 articulações (68%) do Grupo III. Das oito articulações com somente um sinal clínico, sete apresentaram somente efusão articular e uma articulação apresentou somente claudicação.

6.2 FRAGMENTO OSTEOCONDRAIS

Todos os fragmentos osteocondrais provenientes da crista intermédia da tíbia dos animais dos Grupos II e III estavam aderidos ao osso subcondral. Estes fragmentos foram classificados imediatamente após a colheita.

No Grupo II (assintomáticos), uma articulação apresentou fragmento grau 1 (<4 mm), uma articulação fragmento grau 2 (entre 4 e 8 mm), seis articulações fragmento grau 3 (>8 mm) e três articulações fragmento grau 4 (múltiplos fragmentos) (Tabela 1).

No Grupo III (sintomáticos), três articulações apresentaram fragmento grau 2 (entre 4 e 8 mm), dez articulações fragmento grau 3 (>8 mm) e doze articulações fragmento grau 4 (múltiplos fragmentos) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos fragmentos osteocondrais das articulações dos Grupos II e III - São Paulo - 2006/2009

GRUPO	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	GRAU 4
GII	1	1	6	3
GIII	—	3	10	12

Das 11 articulações sem sinais clínicos (GII), em apenas três (27,3%) havia presença de múltiplos fragmentos, enquanto que das 25 articulações com sinais clínicos (GIII), em 12 (48,0%) havia múltiplos fragmentos.

Ao analisar a densidade de frequência de sinal clínico entre as articulações em que existia fragmento osteocondral único, independente do seu tamanho, ou múltiplos fragmentos, observou-se que 38% das articulações com um fragmento não apresentavam sinal clínico (Grupo II) e, em 62% dos casos, havia sinal clínico (Grupo III). Já nas articulações com múltiplos fragmentos, apenas 20% das articulações não apresentaram sinal clínico (Grupo II), sendo as restantes 80% classificadas no Grupo III (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Densidade de frequência de sinal clínico com a presença de fragmento osteocondral único e a de múltiplos fragmentos nos Grupos II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

6.3 ANÁLISE FÍSICA, CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DAS CÉLULAS E DOSAGEM DA PROTEÍNA TOTAL DO LÍQUIDO SINOVIAL

Os resultados da análise física quanto à coloração, aspecto e viscosidade, bem como a contagem global das células e a dosagem da proteína total do líquido sinovial estão apresentados nas tabelas 2, 3 e 4.

O pequeno número de células encontradas nos esfregaços, mesmo nos animais portadores de OCD, impossibilitou a contagem diferencial de células no líquido sinovial na grande maioria das amostras analisadas. Por este motivo, a contagem diferencial de células não foi considerada.

A amostra de líquido sinovial da articulação tíbio-társica direita do animal GI9 foi contaminada com sangue no momento da colheita, impossibilitando a análise física.

Tabela 2 - Características do líquido sinovial de articulações sem OCD (GI) - São Paulo - 2006/2009

ANIMAL	ARTICULAÇÃO	COLORAÇÃO	ASPECTO	VISCOSIDADE	CÉLULAS TOTAIS/mm ³	PROTEÍNA TOTAL (g/dL)
E23	GI-1	AP	Límpido	>5	40	1,2
E23	GI-2	AP	Límpido	>5	60	1,0
E24	GI-3	AP	Límpido	>5	20	0,8
E24	GI-4	AP	Límpido	2 a 5	20	1,0
E25	GI-5	AP	Límpido	2 a 5	110	0,8
E25	GI-6	AP	Límpido	2 a 5	100	0,9
E26	GI-7	AP	Límpido	>5	60	1,6
E26	GI-8	AP	Límpido	>5	110	1,6
E27	GI-9	—	—	—	170	1,0
E27	GI-10	AP	Límpido	>5	140	1,4
MÉDIA					83,0	1,13
DP					51,0	0,31

Legenda: TTD, tíbio-társica direita; TTE tíbio-társica esquerda; AP, amarelo palha; AO, amarelo ouro; DP, desvio padrão.

Tabela 3 - Características do líquido sinovial de articulações com OCD assintomáticas (GII) - São Paulo - 2006/2009

ANIMAL	ARTICULAÇÃO	COLORAÇÃO	ASPECTO	VISCOSIDADE	CÉLULAS TOTAIS/mm ³	PROTEÍNA TOTAL (g/dL)
E17	GII-1	AP	Límpido	>5	—	1,1
E18	GII-2	AP	Límpido	>5	170	1,8
E18	GII-3	AP	Límpido	>5	290	1,6
E19	GII-4	AP	Límpido	<2	260	1,1
E19	GII-5	AP	Límpido	2 a 5	400	1,9
E20	GII-6	AP	Límpido	>5	200	1,4
E20	GII-7	AP	Límpido	>5	300	1,4
E21	GII-8	AP	Límpido	>5	100	1,4
E22	GII-9	AV	Semi-turvo	2 a 5	200	1,6
E15	GII-10	AO	Límpido	2 a 5	400	2,4
E16	GII-11	AP	Límpido	>5	—	1,5
MÉDIA					257,8	1,61
DP					101,6	0,36

Legenda: AP, amarelo palha; AO, amarelo ouro; AV, avermelhado; DP, desvio padrão.

Tabela 4 - Características do líquido sinovial de articulações com OCD sintomáticas (GIII)
- São Paulo - 2006/2009

ANIMAL	ARTICULAÇÃO	COLORAÇÃO	ASPECTO	VISCOSIDADE	CÉLULAS TOTAIS/mm ³	PROTEÍNA TOTAL (g/dL)
E1	GIII-1	AO	Límpido	<2	400	1,6
E1	GIII-2	AO	Límpido	<2	300	1,6
E2	GIII-3	AP	Límpido	<2	300	1,0
E2	GIII-4	AP	Límpido	2 a 5	500	0,6
E3	GIII-5	AP	Límpido	>5	300	1,2
E3	GIII-6	AO	Semi-turvo	2 a 5	400	1,2
E4	GIII-7	AP	Límpido	2 a 5	—	2,0
E4	GIII-8	AP	Límpido	<2	—	1,4
E5	GIII-9	AO	Semi-turvo	2 a 5	300	2,0
E6	GIII-10	AO	Límpido	<2	300	1,4
E6	GIII-11	AO	Límpido	<2	200	2,4
E7	GIII-12	AP	Límpido	2 a 5	100	1,0
E7	GIII-13	AP	Límpido	>5	200	0,4
E8	GIII-14	AO	Límpido	2 a 5	1300	1,6
E8	GIII-15	AO	Límpido	2 a 5	1400	1,6
E9	GIII-16	AP	Límpido	<2	100	1,0
E9	GIII-17	AP	Límpido	<2	100	1,2
E10	GIII-18	AP	Límpido	2 a 5	400	1,6
E11	GIII-19	AP	Límpido	2 a 5	300	0,8
E11	GIII-20	AP	Límpido	2 a 5	300	0,6
E12	GIII-21	AP	Límpido	2 a 5	500	1,4
E13	GIII-22	AP	Límpido	2 a 5	700	2,0
E14	GIII-23	AP	Límpido	>5	300	1,0
E15	GIII-24	AP	Límpido	2 a 5	300	1,6
E16	GIII-25	AP	Límpido	2 a 5	—	1,1
MÉDIA					409,1	1,33
DP					331,1	0,58

Legenda: AP, amarelo palha; AO, amarelo ouro; DP, desvio padrão.

6.3.1 Análise física do líquido sinovial

O líquido sinovial de todas as articulações do GI (controle) apresentou coloração amarelo palha. No Grupo II (assintomáticos), nove articulações apresentaram líquido sinovial com coloração amarelo palha (81,9%), uma apresentou líquido sinovial com coloração amarelo ouro (9,05%) e uma com

coloração avermelhada (9,05%). No Grupo III (sintomáticos), 17 articulações apresentaram líquido sinovial com coloração amarelo palha (68%) e oito com coloração amarelo ouro (32%) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Porcentagem (%) da classificação quanto à coloração do líquido sinovial nos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

O aspecto do líquido sinovial de todas as articulações do Grupo I foi classificado como límpido. No Grupo II, o líquido sinovial de 10 articulações foi classificado como límpido (92%) e somente uma articulação apresentou líquido sinovial com aspecto semi-turvo (8%). Fato semelhante ocorreu no Grupo III, onde 23 articulações apresentaram líquido sinovial com aspecto límpido (91%) e duas apresentaram líquido sinovial com aspecto semi-turvo (9%). Em nenhuma articulação dos três grupos foi observado líquido sinovial com aspecto turvo (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Porcentagem (%) da classificação quanto ao aspecto do líquido sinovial nos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

A viscosidade apresentada pelo líquido sinovial dos animais do Grupo I foi considerada normal (>5 cm) em seis articulações (66,7%) e moderadamente diminuída (2 a 5 cm) em três articulações (33,3%). No Grupo II, a viscosidade foi classificada como normal em sete articulações (63,7%), moderadamente diminuída em três articulações (27,3%) e acentuadamente diminuída (<2 cm) em uma articulação (9,1%). No Grupo III, a viscosidade normal foi observada somente em três articulações (8,3%), moderadamente diminuída em 14 articulações (58,3%) e acentuadamente diminuída em oito articulações (33,3%) (Gráfico 5). Houve relação direta entre a viscosidade e a concentração de AH (dados detalhados no item 6.5) para os Grupos I e II. Para o Grupo III esta relação não foi observada (Gráfico 6).

Gráfico 5 - Porcentagem (%) da classificação da viscosidade do líquido sinovial nos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

Gráfico 6 - Relação entre concentração de ácido hialurônico e viscosidade do líquido sinovial nos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

6.3.2 Contagem global de células do líquido sinovial

A contagem global de células/mm³ do líquido sinovial aumentou de forma significativa do Grupo I (83,0±51,0) para o Grupo II (257,8±101,6) ($P<0,05$) e para o Grupo III (409,1±331,1) ($P<0,001$). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) na contagem global de células/mm³ entre os Grupos II e III (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Contagem global de células/mm³ do líquido sinovial dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

6.3.3 Dosagem de proteína total do líquido sinovial

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os valores da concentração de proteína total nos Grupos I (1,13±0,31 g/dL), II (1,61±0,36 g/dL) e III (1,33 ± 0,48 g/dL) (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Concentração da proteína total (g/dL) do líquido sinovial dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

6.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS GAGS URINÁRIOS

Os GAGs urinários foram identificados por eletroforese em gel de agarose, tampão PDA, como descrito em Métodos. As figuras 13,14 e 15 mostram géis representativos.

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos urinários de cavalos hígidos (GI). P: padrão de GAGs contendo CS, DS e HS, 5µg cada - São Paulo - 2006/2009

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos urinários de cavalos assintomáticos com OCD bilateral na articulação tíbio-társicas (GII). P: padrão de GAGs contendo CS, DS e HS, 5µg cada - São Paulo - 2006/2009

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos urinários de cavalos sintomáticos com OCD na articulação tíbio-társicas (GIII). P: padrão de GAGs contendo CS, DS e HS, 5µg cada - São Paulo - 2006/2009

Observa-se que os principais GAGs urinários são CS, DS e HS.

A quantificação dos GAGs urinários foi realizada por densitometria dos géis secos e corados. Como esta quantificação representa a excreção total de GAGs do organismo, os animais E15 e E16 foram excluídos por apresentarem OCD da crista intermédia da tíbia bilateral, sendo uma articulação sem sintomatologia (GII) e uma articulação com sintomatologia (GIII).

As tabelas 5 a 8 apresentam as concentrações de GAGs e creatinina urinários de todos os animais nos diferentes grupos. A razão GAG/creatinina

também é mostrada. Os resultados obtidos dos animais do Grupo III foram divididos em dois subgrupos: OCD sintomática unilateral e bilateral (Tabelas 7 e 8, respectivamente).

Tabela 5 - Concentração de GAGs urinários dos animais do grupo controle (GI) - São Paulo - 2006/2009

Animal	CS (mg/L)	DS (mg/L)	HS (mg/L)	GAG (mg/L)	Creatinina (g/L)	CS/Creat ($\times 10^{-3}$)	DS/Creat ($\times 10^{-3}$)	HS/Creat ($\times 10^{-3}$)	GAG/Creat ($\times 10^{-3}$)
E23	6,57	1,11	1,37	9,06	1,95	3,37	0,57	0,70	4,65
E24	3,72	0,64	0,99	5,35	2,06	1,81	0,31	0,48	2,60
E25	8,97	1,79	2,89	13,65	3,04	2,95	0,59	0,95	4,49
E26	6,10	1,66	2,49	10,25	1,75	3,49	0,95	1,42	5,86
E27	9,38	1,76	3,57	14,72	1,86	5,05	0,95	1,92	7,91
E28	0,54	0,11	0,06	0,71	0,21	2,58	0,52	0,29	3,39
E29	7,61	0,75	1,18	9,55	1,15	6,62	0,65	1,03	8,30
Média	6,13	1,12	1,79	9,04	1,72	3,69	0,65	0,97	5,31
DP	3,11	0,65	1,23	4,80	0,87	1,63	0,23	0,56	2,17

Legenda: CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato; HS, heparam sulfato; GAG, total de glicosaminoglicanos; Creat, creatinina; DP, desvio padrão.

Tabela 6 - Concentração de GAGs urinários dos animais com OCD assintomática unilateral e bilateral (GII) - São Paulo - 2006/2009

Animal	CS (mg/L)	DS (mg/L)	HS (mg/L)	GAG (mg/L)	Creatinina (g/L)	CS/Creat ($\times 10^{-3}$)	DS/Creat ($\times 10^{-3}$)	HS/Creat ($\times 10^{-3}$)	GAG/Creat ($\times 10^{-3}$)
E17	9,22	0,75	1,90	11,86	4,13	2,23	0,18	0,46	2,87
E18	6,17	1,05	2,37	9,60	3,25	1,90	0,32	0,73	2,95
E19	23,29	1,12	2,03	26,43	4,90	4,75	0,23	0,41	5,39
E20	12,57	0,78	2,90	16,25	3,66	3,43	0,21	0,79	4,44
E21	6,76	0,61	1,50	8,87	2,49	2,71	0,24	0,60	3,56
E22	1,69	0,19	0,56	2,44	0,84	2,01	0,23	0,67	2,90
Média	9,95	0,75	1,88	12,57	3,21	2,84	0,24	0,61	3,69
DP	7,46	0,33	0,80	8,14	1,42	1,09	0,05	0,15	1,03

Legenda: CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato; HS, heparam sulfato; GAG, total de glicosaminoglicanos; Creat, creatinina; DP, desvio padrão.

Tabela 7- Concentração de GAGs urinários dos animais com OCD sintomática unilateral (GIII) - São Paulo - 2006/2009

Animal	CS (mg/L)	DS (mg/L)	HS (mg/L)	GAG (mg/L)	Creatinina (g/L)	CS/Creat ($\times 10^{-3}$)	DS/Creat ($\times 10^{-3}$)	HS/Creat ($\times 10^{-3}$)	GAG/Creat ($\times 10^{-3}$)
E5	35,55	2,19	2,33	40,06	3,40	10,45	0,64	0,68	11,78
E10	2,12	0,32	0,66	3,10	0,99	2,14	0,32	0,66	3,13
E12	5,98	0,90	1,95	8,83	3,83	1,56	0,24	0,51	2,30
E13	32,71	2,65	9,77	45,13	4,58	7,14	0,58	2,13	9,85
E14	6,16	0,48	1,41	8,05	1,91	3,22	0,25	0,74	4,21
Média	16,50	1,31	3,22	21,03	2,94	4,90	0,41	0,95	6,26
DP	16,20	1,05	3,72	19,89	1,46	3,79	0,19	0,67	4,27

Legenda: CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato; HS, heparam sulfato; GAG, total de glicosaminoglicanos; Creat, creatinina; DP, desvio padrão.

Tabela 8 - Concentração de GAGs urinários dos animais com OCD sintomática bilateral (GIII) - São Paulo - 2006/2009

Animal	CS (mg/L)	DS (mg/L)	HS (mg/L)	GAG (mg/L)	Creatinina (g/L)	CS/Creat ($\times 10^{-3}$)	DS/Creat ($\times 10^{-3}$)	HS/Creat ($\times 10^{-3}$)	GAG/Creat ($\times 10^{-3}$)
E1	6,67	0,62	1,01	8,30	3,99	1,67	0,16	0,25	2,08
E2	9,98	0,90	1,92	12,80	4,74	2,11	0,19	0,40	2,70
E3	26,19	2,37	5,63	34,19	7,7	3,40	0,31	0,73	4,44
E4	20,44	1,20	1,94	23,58	4,99	4,10	0,24	0,39	4,72
E6	16,87	0,77	0,93	18,57	1,54	10,95	0,50	0,61	12,06
E7	8,93	0,91	1,76	11,59	4,07	2,19	0,22	0,43	2,85
E8	25,80	1,76	2,33	29,88	3,1	8,32	0,57	0,75	9,64
E9	3,98	0,40	1,11	5,49	4,86	0,82	0,08	0,23	1,13
E11	5,68	0,61	0,99	7,28	1,87	3,04	0,32	0,53	3,89
Média	13,84	1,06	1,96	16,85	4,10	4,07	0,29	0,48	4,83
DP	8,68	0,63	1,47	10,35	1,85	3,37	0,16	0,19	3,64

Legenda: CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato; HS, heparam sulfato; GAG, total de glicosaminoglicanos; Creat, creatinina; DP, desvio padrão.

O gráfico 9 mostra que a concentração de CS e GAGs totais urinários é maior nos animais com OCD (Grupos II e III) do que nos animais do grupo controle (Grupo I).

Gráfico 9 - Concentração urinária de glicosaminoglicanos nos animais dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD com sintomatologia unilateral e bilateral) - São Paulo - 2006/2009

Ao avaliar a porcentagem de CS em relação aos GAGs totais corrigidos pela concentração de creatinina urinária, não houve diferença estatisticamente significativa entre o Grupo I (70%) e os Grupo II (75%) e III - com OCD unilateral e sintomatologia (75%). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$), entretanto ao comparar os animais do Grupo I com os animais do Grupo III - com OCD bilateral e sintomatologia (81%) (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Porcentagem (%) de condroitim sulfato em relação aos glicosaminoglicanos urinários totais nos animais dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD com sintomatologia unilateral e bilateral) - São Paulo - 2006/2009

6.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS GAGS DO LÍQUIDO SINOVIAL

A identificação de GAGs do líquido sinovial das articulações dos Grupos I, II e III foi realizada por eletroforese em gel de agarose, tampão PDA, como descrito em Métodos. As figuras 16, 17 e 18 mostram géis representativos.

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos de líquido sinovial de articulações de cavalos hígidos (GI). P1: mistura padrão de GAGs contendo CS, DS e HS, 5 µg cada; AH: AH padrão, 5 µg - São Paulo - 2006/2009

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos de líquido sinovial de articulações tíbio-társicas de cavalos com OCD sintomática (GII). P1: mistura padrão de GAGs contendo CS, DS e HS, 5 µg cada; AH: AH padrão, 5 µg - São Paulo - 2006/2009

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose de glicosaminoglicanos de líquido sinovial de articulações tíbio-társicas de cavalos com OCD assintomática (GIII). P1: mistura padrão de GAGs contendo CS, DS e HS, 5 µg cada; AH: AH padrão, 5 µg - São Paulo - 2006/2009

As tabelas 9, 10 e 11 apresentam as concentrações (em µg/ml) dos GAGs (AH e CS) no líquido sinovial das articulações dos Grupos I, II e III respectivamente.

Tabela 9 - Concentração de GAGs no líquido sinovial das articulações do grupo controle (GI) - São Paulo - 2006/2009

ANIMAL	ARTICULAÇÃO	AH (ug/ml)	CS (ug/ml)
E23	GI-1	1176,88	51,01
E23	GI-2	682,98	53,41
E24	GI-3	757,67	56,64
E24	GI-4	1013,39	54,63
E25	GI-5	510,24	55,08
E25	GI-6	412,84	44,99
E26	GI-7	1093,49	62,02
E26	GI-8	901,56	48,47
E27	GI-9	453,86	36,75
E27	GI-10	717,12	42,10
MÉDIA		772,00	50,51
DP		269,20	7,54

Legenda: AH, ácido hialurônico; CS, condroitim sulfato; DP, desvio padrão.

Tabela 10 - Concentração de GAGs no líquido sinovial das articulações com OCD assintomática (GII) - São Paulo - 2006/2009

ANIMAL	ARTICULAÇÃO	AH (ug/ml)	CS (ug/ml)
E17	GIII-1	660,99	213,87
E18	GIII-2	847,41	61,02
E18	GIII-3	854,70	61,20
E19	GIII-4	348,84	85,00
E19	GIII-5	504,20	92,11
E20	GIII-6	1734,09	213,14
E20	GIII-7	1326,52	171,47
E21	GIII-8	593,41	98,87
E22	GIII-9	703,37	166,52
E15	GIII-10	720,23	312,47
E16	GIII-11	1106,72	115,24
MÉDIA		854,59	144,63
DP		398,13	78,79

Legenda: AH, ácido hialurônico; CS, condroitim sulfato; DP, desvio padrão.

Tabela 11 - Concentração de GAGs no líquido sinovial das articulações com OCD sintomática (GIII) - São Paulo - 2006/2009

ANIMAL	ARTICULAÇÃO	AH (ug/ml)	CS (ug/ml)
E1	GII-1	1274,99	163,07
E1	GII-2	1067,08	126,34
E2	GII-3	1067,58	71,07
E2	GII-4	906,92	125,66
E3	GII-5	710,41	285,62
E3	GII-6	674,41	208,89
E4	GII-7	1091,97	99,64
E4	GII-8	970,97	137,11
E5	GII-9	157,49	106,84
E6	GII-10	730,76	221,67
E6	GII-11	597,46	240,65
E7	GII-12	899,86	130,32
E7	GII-13	1078,75	206,07
E8	GII-14	1034,75	171,99
E8	GII-15	1229,87	208,73
E9	GII-16	712,88	180,08
E9	GII-17	1080,26	170,83
E10	GII-18	965,91	90,43
E11	GII-19	757,99	91,62
E11	GII-20	647,81	69,34
E12	GII-21	1579,92	157,29
E13	GII-22	1209,90	188,83
E14	GII-23	1391,81	175,83
E15	GII-24	1649,01	464,88
E16	GII-25	1859,02	164,28
MÉDIA		1013,91	170,28
DP		369,01	81,88

Legenda: AH, ácido hialurônico; CS, condroitim sulfato; DP, desvio padrão.

O gráfico 11 mostra maior concentração de AH nas articulações dos animais dos Grupos II ($854,59 \pm 398,13 \mu\text{g/ml}$) e III ($1031,91 \pm 369,01 \mu\text{g/ml}$) do que nas articulações do Grupo I ($772,00 \pm 269,20 \mu\text{g/ml}$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos I, II e III.

A concentração de CS nas articulações dos animais dos Grupos II ($144,63 \pm 78,79 \mu\text{g/ml}$) e III ($170,28 \pm 81,88 \mu\text{g/ml}$) também foi maior do que a concentração nas articulações do Grupo I ($50,51 \pm 7,54 \mu\text{g/ml}$), sendo a diferença estatisticamente significativa tanto para o Grupo II ($P < 0,01$) como

para o Grupo III ($P < 0,001$) quando comparadas com o Grupo I. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos II e III (Gráfico 12).

Gráfico 11 - Representação gráfica da concentração de Ácido Hialurônico no líquido sinovial das articulações dos animais dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

Gráfico 12 - Concentração de condroitim sulfato (CS) no líquido sinovial das articulações dos animais dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomático) - São Paulo - 2006/2009

Nos animais com OCD, apesar das concentrações de ambos os GAGs no líquido sinovial estar mais elevada do que o normal, a concentração de CS

cresceu ainda mais. O Gráfico 13 mostra que as relações entre CS e AH são mais altas nos grupos II e III do que nos animais normais (GI).

Gráfico 13 – Relação entre as concentrações de condroitim sulfato (CS) e de ácido hialurônico (AH) no líquido sinovial dos animais dos Grupos I (controle), II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

6.6 DETERMINAÇÃO DE QUERATAM SULFATO (KS) POR *IMMUNOBLOTTING*

A detecção do KS na urina e no líquido sinovial foi realizada por *immunoblotting*. A figura 19A mostra que, na urina, aparece apenas uma banda polidispersa de maior migração, que corresponde a cadeias livres de KS ou a cadeias ligadas a pequenos peptídeos. No líquido sinovial são observadas duas bandas polidispersas, uma que migra como cadeia livres de KS e outra, que permanece próxima à origem do gel, correspondente a moléculas de maior massa molecular (PGs intactos ou parcialmente degradados) (Figura 19B).

O KS foi detectado em todas as amostras dos três grupos analisados.

Figura 19 - *Immunoblotting* revelado com anticorpo MST1, que reconhece queratam sulfato extraído de urina (A) e líquido sinovial (B) de cavalos hípidos (GI) - São Paulo - 2006/2009

6.7 PREPARAÇÃO DA COMP DA CARTILAGEM ARTICULAR

COMP foi extraída de cartilagem articular equina e purificada por cromatografia de troca iônica, como descrito em Métodos. O conteúdo de proteína das 160 frações eluídas da coluna foi estimado pela absorvância a 280 nm, e os proteoglicanos e GAGs foram quantificados pela reação de DMB. A figura 20 mostra a presença de proteína nas frações 30 a 120, com um pico nas frações 45 e 90. Proteoglicanos, detectados pela reação de DMB, foram eluídos em molaridades mais elevadas de sal (frações 82 a 124), conforme esperado. Para determinação de proteoglicanos, alíquotas (10 μ l) de cada fração foram colocadas em microplaca de 96 poços e, em seguida, adicionaram-se 100 μ l do reagente DMB (LIMA; BACCARIN; MICHELACCI, 2007). A absorvância foi lida imediatamente, a 490 nm, em leitora de microplaca³².

³² ELX 800, Universal Microplate Reader – BioTek Instruments Inc., Winoski, EUA

Figura 20 - Curvas de eluição de proteínas (linha azul, OD 280 nm) e de proteoglicanos (linha rosa, DMB) na coluna de DEAE-Sepharose - São Paulo - 2006/2009

Para verificar a presença de COMP, alíquotas de 15 µl de algumas frações, especialmente na região mais rica em proteínas, foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente de 4-16%, em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As frações 45 a 80 apresentaram proteína de alto peso molecular, indicando a possível presença de COMP (Figura 21).

Legenda: P: padrão de peso molecular; números correspondem às frações analisadas.

Figura 21: SDS-PAGE das frações da coluna de DEAE Sepharose, corado com Coomassie Blue - São Paulo - 2006/2009

A análise das frações alternadas, totalizando 80 amostras, por *dot blotting* com anticorpo anti-COMP equino evidenciou maior concentração desta molécula nas frações 40 a 76 (Figura 22). Algumas frações deste intervalo foram então submetidas ao método de *Western blotting* utilizando-se o mesmo anticorpo, confirmando a presença de COMP (Figura 23). As frações 40 a 78 foram combinadas, e esta preparação passou a ser utilizada como padrão para detecção e dosagem de COMP.

Figura 22 - *Dot blotting* das frações da coluna de DEAE Sepharose demonstrando maior intensidade de reação com anticorpo anti-COMP equino no intervalo entre as frações 40 e 76 - São Paulo - 2006/2009

Figura 23 - Western blotting das frações 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 78 reveladas com anticorpo anti-COMP equino - São Paulo - 2006/2009

6.8 DETECÇÃO DA COMP DO LÍQUIDO SINOVIAL POR IMMUNOBLOTTING

A detecção da COMP no líquido sinovial foi realizada por *immunoblotting*. Nos animais do Grupo I foram observadas duas bandas principais, com pesos moleculares na faixa de 200 kDa e de 100 kDa. Nos animais dos Grupos II (OCD assintomática) e III (OCD sintomática) apenas uma banda, migrando entre 50 e 100 kDa, foi observada (correspondente a moléculas menores).

COMP foi detectada em líquido sinovial de animais de todos os grupos. Entretanto, nos grupos com OCD (Grupos II e III), houve predomínio de bandas de maior migração no gel de poliácridamida (menor tamanho molecular), quando comparado ao perfil do Grupo I (Figuras 24 e 25).

Figura 24 – *Immunoblotting* e perfil migratório da COMP em amostras de líquido sinovial. A: amostra de líquido sinovial do Grupo I (controle); B: amostra de líquido sinovial do Grupo III (OCD sintomática); C: sobreposição dos padrões migratórios - São Paulo - 2006/2009

Figura 25 - Perfil migratório da COMP em amostras de líquido sinovial. A: COMP padrão; B: amostra de líquido sinovial do Grupo II (OCD assintomática); C: amostra de líquido sinovial do Grupo III (OCD sintomática); D: sobreposição dos padrões migratórios - São Paulo - 2006/2009

6.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TECIDOS

6.9.1 Membrana sinovial

A membrana sinovial observada nos três grupos foi a do tipo areolar caracterizada pela predominância de vilosidades.

Foram analisadas quatro amostras de membrana sinovial das articulações do Grupo I (controle). Em todas as amostras deste grupo a presença de vilos foi considerada discreta. A presença de sinoviócitos foi considerada normal (Figura 26).

Figura 26 - Fotomicrografia de membrana sinovial do Grupo I (controle) com presença discreta de vilos delimitados por camada única de sinoviócitos. HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009

Nas quatro amostras analisadas do Grupo II (OCD assintomática), uma amostra apresentou presença discreta de vilos (25%) e três a presença moderada (75%). A presença de sinoviócitos foi considerada normal.

Nas 16 amostras do Grupo III (OCD sintomática) analisadas, quatro apresentaram presença discreta de vilos (25%), oito a presença moderada (50%) (Figura 27) e quatro a presença intensa (25%) (Figura 28). Em 11 amostras (69%) a presença de sinoviócitos foi considerada intensa (Figuras 29 e 30). Uma amostra apresentou infiltrado inflamatório mononuclear.

Figura 27 - Fotomicrografia de membrana sinovial do Grupo III (OCD sintomática) com presença moderada de vilos. HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009

Figura 28 - Fotomicrografia de membrana sinovial do Grupo III (OCD sintomática) com presença intensa de vilos. HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009

Figura 29 - Fotomicrografia de vilos de membrana sinovial do Grupo III (OCD sintomática) com presença intensa de sinoviócitos (setas). HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009

Figura 30 - Fotomicrografia de vilos de membrana sinovial do Grupo III (OCD sintomática) com presença intensa de sinoviócitos. HE, barra = 50µm - São Paulo - 2006/2009

6.9.2 Fragmento osteocondral

A cartilagem articular dos fragmentos dos Grupos II e III foi analisada quanto à presença de fibrilação, fibrose e eburnação (ausência de cartilagem e

exposição do osso subcondral). A presença de proliferação de condrócitos também foi avaliada.

Dos 11 fragmentos osteocondrais do Grupo II (OCD assintomática), sete foram considerados viáveis para análise (Tabela 12), três foram considerados inadequados para análise e um fragmento apresentou apenas tecido conjuntivo necrosado e vascularizado.

No Grupo III (OCD sintomática) 17 fragmentos foram considerados viáveis para análise (Tabela 12 e Figuras 31, 32 e 33), sete foram considerados inadequados para análise e em um fragmento foi observado necrose da cartilagem, com células picnóticas e áreas com início de regeneração.

Tabela 12 - Alterações histológicas observadas nos fragmentos osteocondrais das articulações do Grupo II (OCD assintomática) e Grupo III (OCD sintomática) - São Paulo - 2006/2009

GRUPO Nº	FIBRILAÇÃO		FIBROSE		EBURNAÇÃO		PROLIFERAÇÃO DE CONDRÓCITOS	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
GRUPO II (7)	7	100	2	29	5	72	7	100
GRUPO III (17)	16	94	1	6	7	41	15	88

Figura 31 - Fotomicrografia de fragmento osteocondral do Grupo III (OCD sintomática) com presença de fibrilação da cartilagem. HE, barra = 100µm - São Paulo - 2006/2009

Figura 32 - Fotomicrografia de fragmento osteocondral do Grupo III (OCD sintomática) com presença de fibrilação e eburnação da cartilagem. HE, barra = 100μm - São Paulo - 2006/2009

Figura 33 - Fotomicrografia de cartilagem de fragmento osteocondral do Grupo III (OCD sintomática) com presença de proliferação de condrócitos (setas). HE, barra = 50μm - São Paulo - 2006/2009

A coloração metacromática com azul de toluidina confirma a presença de proteoglicanos (PGs) na cartilagem articular dos fragmentos (Figura 34). Ao analisar toda superfície dos fragmentos recoberta por cartilagem, foi observada

diferença na concentração de PGs em diferentes regiões de um mesmo fragmento osteocondral (Figura 35).

Figura 34 - Corte histológico de fragmento osteocondral do Grupo III (OCD sintomática) com coloração metacromática com azul de toluidina, indicando a presença de PGs. A) barra = 200 μ m; B) barra = 150 μ m - São Paulo - 2006/2009

Figura 35 - Corte histológico de fragmento osteocondral com coloração metacromática com azul de toluidina, indicando a diferença de concentração de PGs em diferentes regiões de um mesmo fragmento osteocondral do Grupo III (OCD sintomática). Barra = 200 μ m - São Paulo - 2006/2009

7 DISCUSSÃO

A osteocondrite dissecante (OCD) é um tipo de osteocondrose que resulta de falha no processo de diferenciação celular da cartilagem em crescimento, levando ao espessamento ou retenção de cartilagem, com surgimento de fissuras e eventual liberação de fragmentos na cavidade articular (McILWRAITH; NIXON, 1996). Por existirem fortes indícios de que, nos equinos, o surgimento de tais lesões ocorra durante o primeiro ano de vida (CARLSON; CULLINS; MEUTEN, 1995; DICK; ENZERINK; VAN WEEREN, 1999), a maioria dos estudos sobre esta doença se concentra nesta fase, com o objetivo de identificar quais são os fatores desencadeantes e quais são as medidas eficazes para impedir o surgimento e progressão de tais lesões.

Pouco se sabe sobre a condição da articulação doente em animais com idade superior a um ano, já em fase de doma ou treinamento, e se a doença está estável, principalmente em animais assintomáticos. Mesmo assim, animais sem a sintomatologia da doença são operados para comercialização posterior ou para impedir a progressão da doença.

Jørgensen et al. (1997) e Brehm e Staeker (1999) questionaram a necessidade de tratamento cirúrgico para os casos de OCD assintomática após analisarem os achados radiológicos e o desempenho atlético de animais doentes. Segundo estes autores, não houve diferença em relação ao número de vitórias, colocações e velocidade máxima entre animais sadios e animais com OCD, exceto para os casos com lesões múltiplas. McIlwraith (1993a) relatou opinião semelhante ao supor que a ausência de sinais clínicos pode estar associada à estabilidade entre a lesão e o osso adjacente.

Para investigar este ponto, o presente estudo visou analisar mais profundamente, por meio de estudos histológicos e moleculares, as articulações tíbio-társicas de equinos com OCD na crista intermédia da tíbia com idade superior a um ano e comparar animais saudáveis com animais com OCD nas formas sintomática e assintomática.

Em ambos os grupos de animais com OCD houve predomínio de equinos das raças BH e PSL, caracterizadas pelo rápido crescimento e elevado peso corporal. Estes fatores foram associados à predisposição ao desenvolvimento da OCD em equinos por Watkins (1999).

Neste estudo, a forma bilateral da doença foi mais frequente do que a unilateral, o que reforça a necessidade de realizar o exame radiográfico complementar na articulação contralateral ao se deparar com um animal com OCD sintomática em uma articulação. Outro achado relevante, não relatado na literatura consultada, foi o fato de não ter havido predisposição para o desenvolvimento da doença no lado direito ou esquerdo. Nas articulações avaliadas, em ambos os grupos a distribuição foi de praticamente 50% para cada lado.

A efusão articular reflete o aumento na produção de líquido sinovial e da permeabilidade vascular associados à diminuição de sua retirada da articulação (TROTTER; McILWRAITH, 1996). Douglas (1992) relacionou a efusão nos casos de OCD com a presença de fragmentos osteocondrais livres na articulação e à exposição do osso subcondral à cavidade articular atuando como fatores irritantes.

Assim como em outros relatos (HOPE, 1984; McILWRAITH; FOERNER; DAVIS, 1991; HARRISON; EDWARDS, 1996), a efusão articular neste estudo foi o sinal clínico mais frequente, estando presente em quase todas as articulações do Grupo III (OCD sintomática), apesar de não haver fragmentos livres ou exposição de osso subcondral evidente à artroscopia, sugerindo que não seja esse o principal fator desencadeador para o aumento de líquido articular. Embora presente em menor frequência, a claudicação esteve associada à efusão em 68% das articulações deste grupo. Das articulações do Grupo III com somente um sinal clínico, quase que a totalidade apresentou somente efusão, o que nos leva a crer que a efusão articular deve preceder a claudicação, e que uma das causas de claudicação em animais com OCD seja a dor causada pela distensão articular.

Hope (1984) observou maior frequência de efusão na articulação tíbio-társica em equinos com OCD apresentando fragmentos maiores do que 4 mm ou com múltiplos fragmentos. No presente estudo houve predomínio de fragmento osteocondral único, com tamanho superior a 8 mm, nas articulações do Grupo II (OCD assintomática) e de múltiplos fragmentos nas articulações do Grupo III (OCD sintomática) indicando a presença de sinais clínicos está mais relacionada com a presença de múltiplos fragmentos do que com a presença de um fragmento, independentemente de seu tamanho. Segundo McIlwraith, Foerner e

Davis (1991), a presença de grandes fragmentos não influenciou o desempenho atlético de equinos após o tratamento cirúrgico.

A análise física (coloração e aspecto) associada à contagem global de células e dosagem de proteína não permite um diagnóstico específico de doença articular. Entretanto, estas análises permitem a exclusão de alguns quadros clínicos como, por exemplo, trauma ou infecção. Por este motivo estes exames são amplamente utilizados na rotina clínica e foram empregados neste estudo.

O líquido sinovial da articulação tíbio-társica de equinos deve ter a coloração amarelo claro e aspecto translúcido, sem a presença de grumos (VAN PELT, 1967). Estas características foram observadas em todas as articulações avaliadas no Grupo I (controle). Segundo Van Pelt (1967), casos de OCD podem ocasionalmente apresentar líquido sinovial turvo, com a presença de material floculento. O aspecto límpido, ou seja, translúcido, não variou muito entre os grupos, não sendo, portanto, uma alteração marcante nos casos de OCD neste estudo. Já a coloração apresentou-se mais alterada no Grupo III, podendo assim estar associada aos casos mais avançados da doença onde os sinais clínicos já estão evidentes.

O líquido sinovial dos equinos possui poucas células (167 ± 21 céls/mm³) (VAN PELT, 1974). Neutrófilos, linfócitos e células mononucleares são observados, e a porcentagem de neutrófilos no líquido sinovial normal não ultrapassa os 10%. Alterações quantitativas e qualitativas nos leucócitos podem indicar a magnitude da inflamação na membrana sinovial (TROTTER; McILWRAITH, 1996). A contagem global de células no líquido sinovial nos Grupos II e III apresentou aumento significativo ($P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente) em relação ao grupo controle. Este aumento foi maior nas articulações do Grupo III (OCD sintomática), indicando estreita relação entre inflamação e efusão articular com número de células inflamatórias.

Ao contrário do que aconteceu com os demais parâmetros do líquido sinovial analisados, a concentração de proteína total do líquido sinovial no Grupo II (OCD assintomática) foi maior do que a concentração do Grupo I (controle) e do Grupo III (OCD sintomática). Entretanto, os valores médios obtidos nos três grupos permaneceram dentro do padrão de normalidade, ou seja, inferiores a 2,5 g/dL (KORENEK et al., 1992; TROTTER; McILWRAITH, 1996). Frisbie et al. (1999) observaram aumento na concentração de proteína total no líquido

sinovial de cavalos com OCD em diferentes articulações (2,34 g/dL). Mesmo sendo maior do que o valor médio obtido para animais doentes no presente estudo, os valores observados por Frisbie et al. (1997) também permaneceram dentro do padrão de normalidade.

Nos casos de inflamação articular, o conteúdo de proteína total aumenta pelo aumento na permeabilidade vascular, que possibilitaria a entrada de proteínas de maior peso molecular na cavidade articular (VAN PELT, 1974). Entretanto, a presença de efusão articular e, por conseguinte, a diluição do líquido sinovial, pode ter contribuído para a menor concentração no Grupo III em relação ao Grupo II.

A cartilagem articular está em processo contínuo de remodelamento e reparo, nos quais moléculas da MEC são removidas e substituídas. Durante este processo, diferentes macromoléculas (ou fragmentos delas) são liberadas no líquido sinovial e/ou no plasma (SKIÖLDEBRAND et al., 2009).

Muitas destas macromoléculas poderiam funcionar como biomarcadores, auxiliando no melhor entendimento dos processos patofisiológicos das doenças articulares, na identificação de articulações doentes, avaliação do grau de degradação da cartilagem articular, monitorização da resposta à terapia, além de possibilitar um prognóstico (FRISBIE et al., 2008). Estas moléculas podem ser mensuradas não só de forma direta na cartilagem articular ou líquido sinovial, como também no sangue e na urina. Os GAGs e a COMP são considerados biomarcadores diretos do metabolismo da cartilagem (McILWRAITH, 2005) e foram avaliados neste estudo na tentativa de se diferenciar articulações saudáveis de articulações com OCD com e sem sintomatologia.

O método de DMB, que quantifica GAGs sulfatados, é um dos métodos mais difundidos para avaliação da degradação da MEC da cartilagem (FRISBIE et al., 2008). Empregando este método, Alwan et al. (1991), Palmer, Bertone e McClain (1995), Frisbie et al. (2008) relataram o aumento na concentração de GAGs totais no líquido sinovial em cavalos com OA. Grauw et al. (2006) relataram a redução de GAGs totais no líquido sinovial em cavalos com OCD na crista intermédia da tíbia e idade entre 24 e 48 meses e sugeriram estabilização na degradação destas moléculas neste animais.

Para correta utilização deste método, a utilização de curva padrão contendo os principais GAGs do líquido sinovial em sua devida proporção é necessária, pois como eles possuem diferentes coeficientes de extinção molar (capacidade de 1 mol de substância em absorver luz a um dado comprimento de onda), a não utilização ou a proporção inadequada de um destes GAGs leva a obtenção de resultados incorretos. Alwan et al. (1991) utilizaram somente solução CS e KS e Graw et al. (2006) solução contendo CS para dosagem de GAGs totais pelo método de DMB, o que nos leva a crer que os resultados obtidos são irreais, impossibilitando a comparação com os resultados do presente estudo.

O método de eletroforese em gel de agarose, utilizado no presente estudo para identificar e quantificar os GAGs presentes no líquido sinovial, permite a avaliação individualizada de CS, AH e KS. Diferente do que foi observado por Gauw et al. (2006), o Grupo II (OCD assintomática) apresentou aumento significativo na concentração de CS em relação ao Grupo I (controle), indicando que, mesmo sem apresentar sintomatologia da doença, a MEC da cartilagem já apresenta sinais de degradação. Este aumento, entretanto, foi inferior ao apresentado pelo Grupo III (OCD sintomática), o que nos leva a crer que o aumento da degradação está relacionado com a evolução da doença e surgimento de sintomatologia. Este resultado é similar ao relatado por Palmer, Bertone e McClain (1995) em cavalos com OA. Estes autores também sugerem que o CS seja o principal contribuinte para o aumento da concentração total de GAGs sulfatados nos casos de doença articular, e indicam sua mensuração para diagnóstico precoce, uma vez que aumentos na concentração de CS foram observados em animais ainda sem alterações radiográficas.

O AH, sintetizado pelos sinoviócitos da membrana sinovial, é responsável pela característica viscosa do líquido sinovial (PHILIPSON; SCHWARTZ, 1984; PREHM, 1984). Neste trabalho, a viscosidade do líquido sinovial diminuiu consideravelmente no Grupo III em comparação com o Grupo I, e até mesmo com o Grupo II. Embora seja um método subjetivo de avaliação que indica a presença de inflamação (TROTTER; McILWRAITH, 1996), a diminuição da viscosidade neste estudo esteve bastante ligada ao surgimento dos sinais clínicos e, muito provavelmente, à efusão articular.

A redução da viscosidade no líquido sinovial também é relacionada com a redução na concentração e/ou no tamanho da molécula de AH (TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1994). Os valores médios da concentração de AH no líquido sinovial de equinos obtidos em diferentes estudos apresentaram grande variação, que se deve principalmente aos diferentes métodos de análise empregados (ROWLEY; ANTONAS; HILBERT, 1982; HILBERT; ROWLEY; ANTONAS, 1984; TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1994; TULAMO et al., 1996; POPOT et al., 2004; TAYLOR et al., 2006). Mesmo com valores divergentes, de uma forma geral, as articulações doentes apresentaram valores inferiores de AH do que as saudáveis nesses trabalhos (HILBERT; ROWLEY; ANTONAS, 1984; TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1994; TULAMO et al., 1996; TAYLOR et al., 2006). Tulamo, Heiskanen e Salonen (1994) observaram ainda a diminuição do peso molecular do AH somente em articulações com artrite séptica.

No presente estudo, a concentração de AH no líquido sinovial foi maior nos Grupos II e III (OCD assintomática e sintomática, respectivamente) do que no Grupo I (controle), sendo o Grupo III o que apresentou maior aumento. David-Raoudi et al. (2009) observaram o aumento na síntese de AH por sinoviócitos tipo B provenientes de articulações com OA em resposta ao aumento na concentração de CS. Portanto, é possível que o aumento na síntese de AH observado nas articulações com OCD neste trabalho tenha ocorrido em resposta ao aumento na concentração de CS no líquido sinovial, na tentativa de aumentar a viscosidade do líquido, minimizando o processo de degradação da MEC da cartilagem articular.

Ao relacionar a concentração de AH com a viscosidade do líquido sinovial foi observado, somente nos Grupos I e II, que o aumento na concentração de AH foi acompanhado pelo aumento na viscosidade. Já no Grupo III, houve o aumento na concentração de AH sem a presença de aumento na viscosidade. Este fato se deve provavelmente ao aumento na síntese de AH de menor tamanho molecular pela HAS3 que, segundo VIOLA et al. (2008), apresenta aumento de expressão durante processos inflamatórios.

Outra molécula avaliada no líquido sinovial nos diferentes grupos deste estudo foi a COMP. Por interagir com diversas moléculas da MEC da cartilagem como agregam (ROSENBERG et al., 1998; CHEN et al., 2007), colágeno tipo II (HALÁSZ et al., 2007; SKIÖLDEBRAND et al., 2009) e fibronectina (DI CESARE

et al., 2002), a degradação da COMP pode causar um desequilíbrio nas propriedades da MEC e a sua avaliação refletir o estado de todo tecido.

A redução na concentração da COMP nos casos de doença articular em equinos observada por Misumi et al. (2001), Skiöldebrand et al. (2001), Misumi et al. (2002) e Taylor et al. (2006) foi provavelmente decorrente da utilização de anticorpos que reconhecem partículas maiores, ou seja, menos degradadas da molécula. Em seres humanos portadores de doença articular, entretanto, diferentes autores observaram um aumento na concentração da COMP tanto no líquido sinovial (LOHMANDER; SAXNE; HEINEGÅRD, 1994) como no sangue (CLARK et al., 1999; SKOUMAL; KOLARZ; KLINGER, 2003). O mesmo foi observado no líquido sinovial (ARAI et al., 2005), urina (MISUMI et al., 2006) e no sangue (YAMANOKUCHI et al., 2009) de equinos doentes. Associado ao aumento na concentração da COMP, estes autores detectaram a presença de fragmentos menores, indicando a degradação da molécula, ao utilizar anticorpos que reconheciam também partículas menores.

Arai et al. (2008) afirmaram que, para a confirmação do aumento de síntese e *clearance* da COMP em articulações doentes, a análise quantitativa do líquido sinovial deve ser acompanhada de análise qualitativa para avaliar o grau de fragmentação das moléculas. A análise qualitativa da COMP realizada neste estudo nos forneceu informações relevantes em relação à degradação desta molécula uma vez que foi observado, assim como por Arai et al. (2005) e Neidhart et al. (1997) em articulações com diferentes doenças articulares, que as articulações com OCD, tanto assintomáticas como sintomáticas, apresentam redução na presença de fragmentos de alto peso molecular e aumento de fragmentos de baixo peso molecular. Segundo Lohmander, Saxne e Heinegård (1994) este resultado indica que o aumento da COMP nos casos de doença articular decorre provavelmente tanto da degradação da MEC, como do aumento da síntese pelos condrócitos numa tentativa de reparar o tecido lesado.

Diversos métodos já foram utilizados para quantificar os GAGs urinários em diferentes espécies. Michelacci, Glashan e Schor (1989) observaram que o método de precipitação por azul de alcian sofre influência de íons e de ácidos nucleicos presentes na urina. O método de DMB foi comparado ao de eletroforese em gel de agarose em seres humanos, gatos e equinos por Lima, Baccarin e Michelacci (2007). Os autores concluíram que o método de DMB sofre

interferência de outros componentes urinários, tais como pigmentos e sais presentes em maiores concentrações, além de permitir somente identificação dos GAGs totais. Já os métodos de cromatografia de troca iônica e eletroforese em gel de agarose para extração e quantificação de GAGs urinários impedem a interferência de outros componentes urinários e possibilitam a identificação individualizada de CS, DS, HS e KS. Por apresentar tais vantagens, estes métodos foram utilizados no presente estudo para identificar e quantificar os GAGs urinários.

Foi observado um aumento na concentração urinária de CS e de GAGs totais nos animais do Grupo III (OCD sintomática). Ao utilizar a concentração de creatinina urinária como fator de correção, entretanto, a diferença tanto do CS como de GAG total não foi expressiva ao se comparar animais saudáveis com animais com OCD tanto na forma assintomática como sintomática. Além disso, os valores obtidos neste estudo, para os três grupos, foram superiores aos relatados por Vieira et al. (2005) para equinos adultos, sedentários ou atletas, com ou sem osteoartrite, sendo semelhantes somente aos valores de animais jovens cujo aumento de excreção urinária de GAG foi atribuído ao *turnover* tecidual como consequência do aumento da atividade metabólica.

A evidência da degradação da cartilagem articular nas articulações com OCD foi evidenciada ao se avaliar a porcentagem de CS urinário em relação aos GAGs totais. Nos animais do Grupo I (controle), o CS correspondia a ~70% do total de GAGs urinários, que é semelhante aos resultados relatados por Vieira et al. (2005). Nos animais com OCD na forma assintomática e na forma sintomática unilateral, a quantidade relativa de CS subiu para ~75%, enquanto nos animais com OCD sintomática bilateral houve um aumento significativo ($P < 0,01$) na porcentagem de CS urinário (~81%) quando comparados ao controle. Como a cartilagem é o tecido animal que contém a maior concentração de CS e é provável que a maior parte do CS urinário seja proveniente da cartilagem (VIEIRA et al., 2005), acreditamos que o aumento na porcentagem de CS excretado na urina de animais com OCD seja uma evidência da degradação da cartilagem articular, degradação esta que aumenta à medida que a doença se agrava ou acomete mais de uma articulação.

Como a concentração de KS tanto no líquido sinovial, como na urina é inferior a 5µg/ml sua detecção foi realizada por método imunoquímico. No

líquido sinovial o KS foi detectado nos três grupos avaliados tanto na forma de PG, como na forma de cadeias livres. Estas moléculas devem ser provenientes da cartilagem articular, uma vez que não existem evidências indicando que os sinoviócitos sintetizem esta molécula e a cartilagem, por sua vez, é muito rica neste GAG. Na urina dos três grupos foram detectadas moléculas de KS na forma de cadeia livre ou de fragmentos ligados a peptídeos. Como o KS, assim como o CS, está localizado quase que exclusivamente na cartilagem articular, é provável que a quantificação deste GAG na urina reflita a condição da cartilagem articular.

Estes resultados reforçam a utilidade da mensuração dos GAGs urinários para avaliação da degradação da cartilagem articular e do prognóstico nos casos de OCD em equinos. Entre as vantagens de se utilizar a urina ao invés do líquido sinovial estão: utilização de método menos invasivo de colheita e facilidade em se obter maior volume de amostras (VIEIRA et al., 2005).

Entre as principais funções da membrana sinovial estão: a atividade fagocítica e o controle do conteúdo de proteína e ácido hialurônico do líquido sinovial (McILWRAITH, 2001). Estas funções são atribuídas aos sinoviócitos classificados em tipo A, morfológicamente similares a macrófagos e em tipo B, que se assemelham a fibroblastos (CAOLA, 2003).

A membrana sinovial observada nas articulações avaliadas é do tipo areolar. Esta região, rica em elementos celulares e vasos sanguíneos, pode ser a responsável pela homeostase da cavidade articular por produzir líquido sinovial, remover resíduos sólidos intra-articulares, além de controlar eventos imunológicos (IWANAGA, 2000). Jonhanssen e Rejnö (1976) também observaram o predomínio deste tipo de membrana sinovial em equinos que, segundo Shirichi et al. (1999) correspondem à espécie de mamíferos que possui a membrana sinovial mais amplamente recoberta por vilosidade. As características deste tipo de membrana descritas por Iwanaga (2000) foram identificadas nas amostras analisadas dos três Grupos avaliados neste estudo, sendo elas: camada íntima celular, mais espessa, com tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos sanguíneos; e camada superficial, com a presença de vilosidades sinoviais, rica em elementos celulares.

Segundo Iwanaga et al. (2000), a camada celular é constituída por um a três sinoviócitos de espessura. No presente estudo, este fato foi observado tanto

nas membranas sinoviais avaliadas do Grupo I (controle), como do Grupo II (OCD assintomática). A maior parte das amostras avaliadas no Grupo III (OCD sintomática) apresentou proliferação intensa de sinoviócitos. Como os sinoviócitos são responsáveis pela síntese do AH presente no líquido sinovial, o aumento no número destas células pode ter contribuído para a elevação na concentração de AH no líquido sinovial neste grupo.

Os sinoviócitos liberam metaloproteinases, prostaglandinas, radicais livres e citocinas em resposta ao dano articular (McILWRAITH, 2001). A prevalência de múltiplos fragmentos nos animais do Grupo III pode ter induzido os sinoviócitos a liberar maior quantidade de mediadores inflamatórios, contribuindo para a maior degradação da cartilagem articular, identificada pelo aumento na concentração de CS no líquido sinovial, e surgimento de sinais clínicos como efusão articular e claudicação.

A presença moderada de vilos na maioria das articulações do Grupo II (OCD assintomática) e moderada a severa nas articulações do Grupo III (OCD sintomática) coincidem com os achados de Jonhanssen e Rejnö (1976), que observaram hipertrofia das vilosidades sinoviais em articulações com OCD, além de edema, infiltração de células inflamatórias, aumento da vascularização e aumento das células sinoviais, e atribuíram estes achados a um processo inflamatório pronunciado.

As alterações observadas durante a análise histológica dos fragmentos osteocondrais foram similares entre os Grupos II e III. Em ambos os grupos foi observada, com elevada frequência, a presença de fibrilação na superfície da cartilagem articular e a proliferação de condrócitos na região mais profunda. Lillich et al. (1997) também evidenciaram a presença de proliferação de condrócitos em animais com OCD na tíbia. A presença de fibrilação não foi observada provavelmente porque os animais avaliados por estes autores possuíam idade máxima de 24 meses. Em nosso estudo, a fibrilação da cartilagem pode estar relacionada com o maior período de evolução da lesão e com estágios mais tardios da doença.

A coloração metacromática com azul de toluidina indica a presença de proteoglicanos no tecido. Áreas de fragmento osteocondral com redução na metacromasia, observadas em ambos os grupos deste estudo, foram relatadas também em seres humanos com OCD por Koch, Kampen e Laprell (1997) e em

equinos com OCD e OC por Lillich et al. (1997) e Semevolos, Nixon e Brower-Tower (2001) respectivamente. Nakano, Thompson e Aherne (1982, 1985) observaram resultados semelhantes nas lesões de osteocondrose de suínos jovens coradas com safarina-O, além da redução na formação de agregados de agregam que poderia ser a causa da redução da metacromasia. Os autores sugerem que a redução dos agregados possa ser decorrente da diminuição na quantidade do AH ou à incapacidade dos monômeros de agregam em interagir com as moléculas de AH. Além destas possibilidades, acreditamos ainda que a clivagem proteolítica do esqueleto proteico do agregam por enzimas como as o as agrecanases (ou ADAMTS-4 E ADAMTS-5) e metaloproteinases, presentes nos processo de doença articular, possam refletir na redução da metacromasia da cartilagem dos fragmentos osteocondrais.

Conforme já mencionado anteriormente, estes agregados são responsáveis pela resistência à pressão da cartilagem, sendo que a redução dos mesmos poderia acarretar as demais lesões observadas nos fragmentos, como fibrilação e eburnação, além de contribuir para o aumento na concentração de CS no líquido sinovial devido à liberação e deslocamento destas moléculas para a cavidade articular.

8 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra que a OCD na articulação tíbio-társica de equinos com idade superior a um ano leva a processo ativo de degradação da MEC da cartilagem articular.

Apesar de apresentar alterações em menor grau que articulações sintomáticas, as articulações com OCD sem sintomatologia clínica apresentam sinais de inflamação e degradação articular que justificam o tratamento cirúrgico para impedir a progressão da lesão.

REFERÊNCIAS

ALVES, M. J. M.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K.; MICHELACCI, Y. M. Production and characterization of monoclonal antibodies to shark cartilage proteoglycan. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 27, n. 9, p. 2103-2108, 1994.

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

ANDERSSON, M. L. E.; THORSTENSSON, C. A.; ROOS, E. M.; PETERSSON, I. F.; HEINEGÅRD, D.; SAXNE, T. **Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein increase temporarily after physical exercise in patients with knee osteoarthritis**, 2006. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/7/98>>. Acesso em: 04 jan. 2010.

ARAI, K.; MISUMI, K.; CARTER, S. D.; SHINBARA, S.; FUJIKI, M.; SAKAMOTO, H. Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) degradation and synthesis in equine joint disease. ***Equine Veterinary Journal***, v. 37, n. 1, p. 31-36, 2005.

ARAI, K.; TAGAMI, M.; HATAZOE, T.; NISHIMATSU, E.; SHIMIZU, Y.; FUJIKI, M.; MISUMI, K. Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid, serum and urine from 51 racehorses with carpal bone fracture. ***Journal of Veterinary Medical Science***, v. 70, n. 9, p. 915-921, 2008.

BARRY, F. P.; ROSENBERG, L. C.; GAW, J. U.; GAW, J. U.; KOOB, T. J.; NEAME, P. J. N- and O-linked keratan sulfate on the hyaluronan binding region of aggrecan from mature and immature bovine cartilage. ***The Journal of Biological Chemistry***, v. 270, n. 35, p. 20516-20524, 1995.

BERTONE, A. L.; BRAMLAGE, L. R.; McILWRAITH, C. W.; MALEMUD, C. L. Comparison of proteoglycan and collagen in articular cartilage of horses with naturally developing osteochondrosis and healing osteochondral fragments of experimentally induced fractures. ***American Journal of Veterinary Research***, v. 66, n. 11, p. 1881-1890, 2005.

BREHM, W.; STAECKER, W. Osteochondrosis (OCD) in the tarsocrural joint of Standardbred Trotters – correlation between radiographic findings and racing performance. ***Annual Convention Proceedings American Association of Equine Practitioners***, v.45, p. 164-166, 1999.

CAOLA, G. The anatomy and physiology of the diarthroses. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 69-73, 2003. Supplement, 1.

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

CARLSON, C. S.; HILLEY, H. D.; MEUTEN, D. J. Degeneration of cartilage canal vessels associated with lesions of osteochondrosis in swine. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 1, p. 47-54, 1989.

CASTOR, C. W.; CABRAL, A. R. Connective tissue activating peptides. **Methods in Enzymology**, v. 163, p. 731-748, 1988.

CHEN, F. H.; HERNDON, M. E.; PATEL, N.; HECHT, J. T.; TUAN, R. S.; LAWLER, J. Interaction of cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 with aggrecan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 34, p. 24591-24598, 2007.

CLARK, A. G.; JORDAN, J. M.; VILIM, V.; RENNER, J. B.; DRAGOMIR, A. D.; LUTA, G.; KRAUS, V. B. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity. **Arthritis & Rheumatism**, v. 42, n. 11, p. 2356-2364, 1999.

COHEN, D. M.; MOURÃO, P. A.; DIETRICH, C. P. Differentiation of mucopolysaccharidoses by analyses of the excreted sulfated mucopolysaccharides. **Clinica Chimica Acta**, v. 80, n. 3, p. 550-562, 1977.

DAVI-RAOUDI, M.; DESCHREVEL, B.; LECLERCQ, S.; GALERA, P.; BOUMEDIENE, K.; PUJOL, J. P. Chondroitin sulfate increases hyaluronan production by human synoviocytes through differential regulation of hyaluronan synthases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 3, p. 760-770, 2009.

DI CESARE, P.; HAUSER, N.; LEHMAN, D.; PASUMARTI, S.; PAULSSON, M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 354, n. 2, p. 237-240, 1994.

DI CESARE, P. E.; CHEN, F. S.; MOERGELIN, M.; CARLSON, C. S.; LESLIE, M. P.; PERRIS, R.; FANG, C. Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. **Matrix Biology**, v. 21, n. 5, p. 461-470, 2002.

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

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DOUGLAS, J. The pathogenesis and clinical manifestations of equine osteochondrosis. **Veterinary Medicine**, v. 87, n. 8, p. 826-833, 1992.

DUDHIA, J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 19-20, p. 2241-2256, 2005.

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

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

FELL, H. B.; GLAUERT, A. M.; BARRATT, M. E. J.; GREEN, R. The pig synovium. I. The intact synovium in vivo and in organ culture. **Journal of Anatomy**, v. 122, n. 3, p. 663-680, 1976.

FORSLIND, K.; EBERHARDT, K.; JONSSON, A.; SAXNE, T. Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. **British Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 9, p. 593-598, 1992.

FRISBIE, D. D.; AL-SOBAYIL, F.; BILLINGHURST, R. C.; KAWCAK, C. E.; McILWRAITH, C. W. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 10, p. 1196-1204, 2008.

FRISBIE, D. D.; RAY, C. S.; IONESCU, M.; POOLE, A. R.; CHAPMAN, P. L.; McILWRAITH, C. W. Measurement of synovial fluid and serum concentration of the 846 epitope of chondroitin sulfate and carboxy propeptides of type II

procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 3, p. 306-309, 1999.

GØNDAHL, A. M. The incidence of osteochondrosis in the tibiotarsal joint of norwegian standardbred trotters – A radiographic study. **Equine Veterinary Science**, v. 11, n. 5, p. 272-274, 1991.

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

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

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.

HALÁSZ, K.; KASSNER, A.; MÖRGELIN, M.; HEINEGÅRD, D. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 43, p. 31166-31173, 2007.

HARDINGHAM, T. E.; EWINS, R. J. F.; MUIR, H. Cartilage proteoglycans. Structure and heterogeneity of the protein core and the effects of specific protein modifications on the binding to hyaluronate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 157, n. 1, p. 127-143, 1976.

HARDINGHAM, T. E.; MUIR, H. Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. **The Biochemical Journal**, v. 139, n. 3, p. 565-581, 1974.

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

HASCALL, V. C.; HEINEGÅRD, D. Aggregation of cartilage proteoglycans. I. The role of hyaluronic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 13, p. 4232-4241, 1974.

HASCALL, V. C.; RIOLO, R. L. Characteristics of protein-keratin sulfate core and keratin sulfate prepared from bovine nasal cartilage proteoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 14, p. 4529-4538, 1972.

HASSELL, J. R.; KIMURA, J. H.; HASCALL, V. C. Proteoglycan core protein families. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 539-567, 1986.

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

HEINEGÅRD, D.; HASCALL, V. C. Aggregation of cartilage proteoglycans.III. Characteristics of the proteiks isolated from trypsiix digests of aggregates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 13, p. 4250-4256, 1974.

HELAL, I. E.; MISUMI, K.; TATENO, O.; KODAMA, T.; ISHIMARU, M.; YAMAMOTO, J.; MIYAKOSHI, D.; FUJIKI, M. Effect of exercise on serum concentration of cartilage oligomeric matrix protein in Thoroughbreds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 2, p. 134-140, 2007.

HILBERT, B. J.; ROWLEY, G.; ANTONAS, K. N. Hyaluronic acid concentration in synovial fluid from normal and arthritic joints of horses. **Australian Veterinary Journal**, v. 61, n. 1, p. 22-24, 1984.

HOPE, F. Radiological investigations of osteochondrosis dissecans in Standardbred Trotters and Swedish Warmblood horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 5, p. 425-429, 1984.

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

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

ITANO, N.; SAWAI, T.; YOSHIDA, M.; LENAS, P.; YAMADA, Y.; IMAGAWA, M.; SHINOMURA, T.; HAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, Y.; OHNUKI, Y.; MIYAUCHI, S.; SPICER, A. P.; McDONALD, J. A.; KIMATA, K. Three isoforms of mammalian

hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 35, p. 25085-25092, 1999.

IWANAGA, T.; SHIKICHI, M.; KITAMURA, H.; YANASE, H.; NAZAWA-INOUE, K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. **Archives of Histology and Cytology**, v. 63, n. 1, p. 17-31, 2000.

JAIQUES, L. B.; BALUEUX, R. E.; DIETRICH, C. P.; KAVANAGH, L. W. A microelectrophoresis method for heparin. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 351-360, 1968.

JEFFCOTT, L. B. Osteochondrosis in the horse – searching for the key to pathogenesis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 5, p. 331-338, 1991.

JEFFCOTT, L. B. Osteochondrosis – an international problem for the horse industry. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 16, n. 1, p. 32-37, 1996.

JONHANSSON, H. E.; REJNÖ, S. Light and electron microscopic investigation of equine synovial membrane – A comparison between healthy joints with intra-articular fractures and osteochondrosis dissecans. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 17, n. 2, p. 153-168, 1976.

JØRGENSEN, H. S.; PROSCHOWSKY, H.; FALK-RØNNE, J.; WILLEBERG, P.; HESSELHOLT, M. The significance of routine radiographic findings with respect to subsequent racing performance and longevity in Standardbred trotters. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 1, p. 55-59, 1997.

KAPLAN, D.; MEYER, K. Ageing of human cartilage. **Nature**, v. 183, n. 4670, p. 1267-1268, 1959.

KIANI, C.; CHEN, L.; WU, Y. J.; YEE, A. J.; YANG, B. B. Structure and function of aggrecan. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 19-32, 2002.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 443-475, 1991.

KNUDSON, C. B.; KNUDSON, W. Cartilage Proteoglycans. **Cell & Developmental Biology**, v. 12, n. 2, p. 69-78, 2001.

KOCH, S.; KAMPEN, W. U.; LAPRELL, H. Cartilage and bone morphology in osteochondritis dissecans. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 5, n. 1, p. 42-45, 1997.

KORENEK, N. L.; ANDREWS, F. M.; MADDUX, J. M.; SANDERS, W. L.; FAULK, D. L. Determination of total protein concentration and viscosity of synovial fluid from the tibiotarsal joints of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 5, p. 781-84, 1992.

LILLICH, J. D.; BERTONE, A. L.; MALEMUD, C. J.; WEISBRODE, S. E.; RUGGLES, A. J.; STEVENSON, S. Biochemical, histochemical, and immunohistochemical characterization of distal tibia osteochondrosis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 1, p. 89-98, 1997.

LIMA, C. R.; BACCARIN, R. Y. A.; MICHELACCI, Y. M. Reliability of 1,9-dimethylmethylene blue tests in comparison to agarose gel electrophoresis for quantification of urinary glycosaminoglycans. **Clinica Chimica Acta**, v. 378, n. 1-2, p. 206-215, 2007.

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

LITTLE, C. B.; HILBERT, B. J.; WICKSTROM, S.; HEDLUND, B. E. Quantitative microanalysis of equine synovial fluid glycosaminoglycans concentration. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 10, p. 1534-1539, 1990.

LOHMANDER, L. S.; SAXNE, T.; HEINEGÅRD, D. K. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 53, n. 1, p. 8-13, 1994.

MAPP, P. I.; REVELL, P. A. Fibronectin production by synovial intimal cells. **Rheumatology International**, v. 5, n. 5, p. 229-237, 1985.

MARTEL-PELLETIER, J.; BOILEAU, C.; PELLETIER, J. P.; ROUGHLEY, P. J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 351-384, 2008.

McILWRAITH, C. W. Experiences in diagnostic and surgical arthroscopy in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 1, p. 11-19, 1984.

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

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

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

McILWRAITH, C. W. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 5, p. 473-482, 2005.

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

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

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

MEYER, K.; PALMER, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 629-634, 1934.

MICHELACCI, Y. M.; CADAVAL, R. A. M.; ROVIGATTI, R. M.; KOHLMANN-JR., O. Renal and urinary glycosaminoglycans in an experimental model of chronic renal failure in rats. **Experimental Nephrology**, v. 9, n. 1, p. 40-48, 2001.

MICHELACCI, Y. M.; GLASHAN, R. Q.; SCHOR, N. Urinary excretion of glycosaminoglycans in normal and stone forming subjects. **Kidney International**, v. 36, n. 6, p. 1022-1028, 1989.

MICHELACCI, Y. M.; LAREDO, J.; DIETRICH, C. P. Proteoglycans and chondroitin sulfates from human multiple chondroma (enchondromatosis). **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 14, n. 2-3, p. 161-172, 1981.

MICHELACCI, Y. M.; MOURÃO, P. A. S.; LAREDO-FILHO, J.; DIETRICH, C. P. Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilages. **Connective Tissue Research**, v. 7, 29-36, 1979.

MISUMI, K.; TAGAMI, M.; KAMIMURA, T.; MIYAKOSHI, D.; HELAL, I. E.; ARAI, K.; FUJIKI, M. Urine cartilage oligomeric matrix protein (COMP) measurement is useful in discriminating the osteoarthritic Thoroughbreds. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 11, p. 1174-1180, 2006.

MISUMI, K.; VILIM, V.; CLEGG, P. D.; THOMPSON, C. C. M.; CARTER, S. D. Measurement of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in normal and diseased equine synovial fluids. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, n. 2, p. 119-127, 2001.

MISUMI, K.; VILIM, V.; HATAZOE, T.; MURATA, T.; FUJIKI, M.; OKA, T.; SAKAMOTO, H.; CARTER, S. D. Serum level of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 5, p. 602-608, 2002.

MÖRGELIN, M.; HEINEGÅRD, D.; ENGEL, J.; PAULSSON, M. Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 9, p. 6137, 6141, 1992.

MOURÃO, P. A. S.; MICHELACCI, Y. M.; TOLEDO, O. M. S. Glycosaminoglycans and proteoglycans of normal and tumoral cartilages of humans and rats. **Cancer Research**, v. 39, n. 7, p. 2802-2806, 1979.

MURRAY, R. C.; SMITH, R. K.; HENSON, F. M. D.; GOODSHIP, A. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine carpal articular cartilage and its variation with exercise and cartilage deterioration. **The Veterinary Journal**, v. 162, p. 121-128, 2001.

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

NAKANO, T.; THOMPSON, J. R.; AHERNE, F. X. Cartilage proteoglycans from normal and osteochondrotic porcine joints. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, n. 2, p. 219-226, 1985.

NAKANO, T.; THOMPSON, J. R.; AHERNE, F. X. Molecular size of chondroitin sulfate from normal and osteochondrotic joint cartilage of adolescent boars. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, n. 4, p. 395-399, 1982.

NEIDHART, M.; HAUSER, N.; PAULSSON, M.; DICESARE, P. E.; MICHEL, B. A.; HÄUSELMANN, H. J. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. **British Journal of Rheumatology**, v. 36, n. 11, p. 1151-1160, 1997.

NEIDHART, M.; MULLER-LADNER, U.; FREY, W.; BOSSERHOFF, A. K.; COLOMBANI, P. C.; FREY-RINDOVA, P.; HUMMEL, K. M.; GAY, R. E.; HAUSELMANN, H.; GAY S. Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 8, n. 3, p. 222-229, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carbohydrates and Glycobiology In: _____ **Lehninger principles of biochemistry**. 5^a ed. New York: W.H. Freeman, 2008. p. 235-270.

OLDBERG, A.; ANTONSSON, P.; LINDBLOM, K.; HEINEGÅRD, D. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 31, p. 22346-22350, 1992.

PALMER, J. L.; BERTONE, A. L.; McCLAIN, H. Assessment of glycosaminoglycans concentration in equine synovial fluid as a marker of joint disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 3, p. 205-212, 1995.

PEREIRA, D. A.; AGUIAR, J. A. K.; HAGIWARA, M. K.; MICHELACCI, Y. M. Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1672, n. 1, p. 1-11, 2004.

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

PHILIPSSON, J.; ANDREASSON, E.; SANDGREN, B.; DALIN, G.; CARLSTEN, J. Osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the

fetlock joints in Standardbred trotters. II. Heritability. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, p. 38-41, 1993. Supplement.

PHILIPSON, L. H.; SCHWARTZ, N. B. Subcellular localization of hyaluronate synthetase in oligodendroglioma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 8, p. 5017-5023, 1984

PLATT, D. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. In: McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: WB Saunders, 1996. p. 29-39.

PLATT, D.; BIRD, J. L. E.; BAYLISS, M. T. Ageing of equine articular cartilage: structure and composition of aggrecan and decorin. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n. 1, p. 43-52, 1998.

POPOT, M. A.; BONNAIRE, Y.; GUÉCHOT, J.; TOUTAIN, P. L. Hyaluronan in horses: physiological production rate, plasma and synovial fluid concentrations in control conditions and following hyaluronate administration. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 6, p. 482-487, 2004.

PREHM, P. Hyaluronate is synthesized at plasma-membranes. **The Biochemical Journal**, v. 220, n. 2, p. 597-600, 1984.

REDDING, W. R. Use of ultrasonography in the evaluation of joint disease in horses. Part 1: indications, technique and examination of the soft tissues. **Equine Veterinary Education**, v. 13, n. 4, p. 198-204, 2001a.

REDDING, W. R. Use of ultrasonography in the evaluation of joint disease in horses. Part 2: examination of the articular surface. **Equine Veterinary Education**, v. 13, n. 5, p. 275-280, 2001b.

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

ROSENBERG, K.; OLSSON, H.; MÖRGELIN, M.; HEINEGÅRD, D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 32, p. 20397-20403, 1998.

ROUGHLEY, P.; MARTENS, D.; RANTAKOKKO, J.; ALINI, M.; MWALE, F.; ANTONIOU, J. The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage. **European Cells and Materials**, v. 11, p. 1-7, 2006.

ROUGHLEY, P. J. The structure and function of cartilage proteoglycans. **European Cells and Materials**, v. 12, p. 92-101, 2006.

ROWLEY, G.; ANTONAS, K. N.; HILBERT, B. J. Quantitation of hyaluronic acid in equine synovia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 6, p. 1096-1099, 1982.

SAARI, H.; YRJÖ, T. K.; FRIMAN, C.; SORSA, T. Differential effects of reactive oxygen species on native synovial fluid and purified human umbilical cord hyaluronate. *Inflammation*, v. 17, n. 4, p. 403-415, 1993.

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

SAXNE, T.; GLENNÄS, A.; KVIEN, T. K.; MELBY, K.; HEINEGÅRD, D. Release of cartilage macromolecules into synovial fluid in acute and prolonged phases of reactive arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 1, p. 20-25, 1993.

SAXNE, T.; HEINEGÅRD, D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. **British Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 9, p. 583-591, 1992.

SCOTT, J. E. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. **The FASEB Journal**, n.6, p. 2639-2645, 1992.

SEMEVOLOS, S. A.; NIXON, A. J.; BROWER-TOLAND, B. D. Changes in molecular expression of aggrecan and collagen types I, II and X, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor β 1 in articular cartilage obtained from horses with naturally acquired osteochondrosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1088-1094, 2001.

SHIKICHI, M.; KITAMURA, H. P.; YANASE, H.; KONNO, A.; TAKAHASHI-IWANAGA, H.; IWANAGA, T. Three-dimensional ultra structure of synoviocytes in the horse joint as revealed by scanning electron microscope. **Archives of Histology and Cytology**, v. 62, n. 3, p. 219-229, 1999.

SHINGLETON, W. D.; MACKIE, E. J.; CAWSTON, T. E.; JEFFCOTT, L. B. Cartilage canals in equine articular/ epiphyseal growth cartilage and a possible association with dyschondroplasia. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 5, p. 360-364, 1997.

SHIVELY, J. A.; SICKLE, V. Scanning electron miscroscopy of equine synovial membrane. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 5, p. 681-684, 1977.

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

ŠIMŮNEK, Z.; MUIR, H. Proteoglycans of the knee-joint cartilage of young normal and lame pigs. **Biochemical Journal**, v. 130, n. 1, p. 181-187, 1972.

SKIÖLDEBRAND, E.; EKMAN, S.; HEINEGÅRD, D.; HULTENBY, K. Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in the articular cartilage on the equine third carpal bone in trained and untrained horses. **Research in Veterinary Science**, 2009. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/RVSC>. Acesso em: 28 jan. 2010.

SKIÖLDEBRAND, E.; LORENZO, P.; ZUNINO, L.; RUCKLIDGE, G. J.; SANDGREN, B.; CARLSTEN, J.; EKMAN, S. Concentration of collagen, aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid from equine middle carpal joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 4, p. 394-402, 2001.

SKOUMAL, M.; KOLARZ, G.; KLINGER, A. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein. A predicting factor and a valuable parameter for disease management in rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 3, p. 156-161, 2003.

SMITH, R. K. W.; ZUNINO, L.; WEBBON, P. M.; HEINEGÅRD, D. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. **Matrix Biology**, v. 16, p. 255-271, 1997.

SZTROLOVICS, R.; ALINI, M.; ROUGHLEY, P. J.; MORT, J. S. Aggrecan degradation in human intervertebral disc and articular cartilage. **The Biochemical Journal**, v. 326, pt. 1, p. 235-241, 1997.

TAYLOR, S. E.; WEAVER, M. P.; PITSILLIDES, A. A.; WHEELER, B. T.; WHEELER-JONES, C. P. D.; SHAW, D. J.; SMITH, R. K. W. Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronan levels in synovial fluid from horses with osteoarthritis of the tarsometatarsal joint compared to a control population. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 6, p. 502-507, 2006.

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

TROTTER, G. W.; McILWRAITH, C. W. Clinical features and diagnosis of joint disease. In: McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 120-145.

TULAMO, R. M.; HEISKAMEN, T.; SALOMEN, M. Concentration and molecular weight distribution of hyaluronate in synovial fluid from clinically normal horses and horses with diseased joints. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 5, p. 710-715, 1994.

TULAMO, R. T.; HOUTTU, J.; TUPAMÄKI, A.; SALONEN, M. Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritides. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 6, p. 932-937, 1996.

VAN PELT, R. W. Characteristics of normal equine tarsal synovial fluid. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 31, n. 12, p. 342-347, 1967.

VAN PELT, R. W. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 1, p. 91-95, 1974.

VIEIRA, F. A. C.; BACCARIN, R. Y. A.; AGUIAR, J. A. K.; MICHELACCI, Y. M. Urinary excretion of glycosaminoglycans in horses: changes with age, training, and osteoarthritis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 25, n. 9, p. 387-400, 2005.

VIEIRA, F. A. C. **Efeito da idade, sexo, osteoartrite e exercício físico sobre a excreção urinária de glicosaminoglicanos em cavalos**. 2005. 125 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2005.

VIOLA, M.; VIGETTI, D.; GENASETTI, A.; RIZZI, M.; KAROUSOU, E.; MORETTO, P.; CLERICI, M.; BARTOLINI, B.; PALLOTTI, F.; DE LUCA, G.; PASSI, A. Molecular control of hyaluronan biosynthesis. **Connective Tissue Research**, v. 49, n. 3, p. 111-114, 2008.

WASSERMAN, R. H.; HALLFELZS, F. A.; LUST, G. Ossos, articulações e líquido sinovial. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. P. 488-520.

WATKINS, J. P. Osteochondrosis, In: AUER, J. **Equine surgery**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999. p. 765-778.

WEISSMAN, B.; MEYER, K.; SAMPSON, P.; LINKER, A. Isolation of oligosaccharides enzymatically produced from hyaluronic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 208, n. 1, p. 417-419, 1954.

YAMANOKUCHI, K.; TAGAMI, M.; NISHIMATSU, E.; SHIMIZU, Y.; HIROSE, Y.; KOMATSU, K.; MISUMI, K. Sandwich ELISA system for cartilage oligomeric matrix protein in equine synovial fluid and serum. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, p. 41-46, 2009.

ANEXO

ANEXO A - Ficha de exame de claudicação utilizada pelo Serviço de Clínica de Equinos ou pelo Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário – FMVZ-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HOVET

EXAME DE CLAUDICAÇÃO

Nome _____ Prontuário _____ Data _____

Proprietário _____ Clínico _____

Grau 1 = QUASE IMPERCEPTÍVEL / Grau 2 = LEVE / Grau 3 = MODERADO
Grau 4 = SEVERO / Grau 5 = IMPOTÊNCIA FUNCIONAL

	MEMBRO	GRAU	COMENTÁRIOS
1 - APARÊNCIA GERAL			
2 - DOR PALPÁVEL			
3 - EDEMA OU CALOR			
4 - SENSIBILIDADE DE CASCO			
5 - PASSO			
6 - TROTE			
7 - CÍRCULO À DIREITA			
8 - CÍRCULO À ESQUERDA			
9 - RECUAR			

10 - SENSIBILIDADE MUSCULAR: PRESENTE (+) AUSENTE (-)

PESCOÇO D	PESCOÇO E	OMBRO D	OMBRO E	COSTAS	GARUPA D	GARUPA E

11 - TESTES DE FLEXÃO ARTICULAR

INTERFALANGEANA	AD	AE
	PD	PE
BOLETO	AD	AE
	PD	PE
CARPO / TARSO	AD	AE
	PD	PE
COTOVELO	AD	AE
PATELA	PD	PE

12 - TESTES DE EXTENSÃO ARTICULAR

ESCÁPULO-UMERAL	AD	AE
COTOVELO	AD	AE
TARSO	PD	PE

13 - BLOQUEIOS ANESTÉSICOS NERVOSOS

BLOQUEIO	MEMBRO	% MELHORA	COMENTÁRIO
RAMOS POSTERIORES			
ABAXIAL			
PONTOS BAIXOS			
PONTOS ALTOS			
ANTEBRAQUIAL / ULNAR			
TIBIAL / PERONEOS			

14 - ANESTESIAS INTRARTICULARES:

	AD	AE	PD	PE
AID				
AIP				
BOLETO				
CARPO / TARSO				
COTOVELO / RÓTULA				
ESCÁPULO - UMERAL				
COXO - FEMURAL				

15 - MÉTODOS AUXILIARES DIAGNÓSTICOS:

RADIOLÓGICO () ULTRA-SONOGRÁFICO () ANÁLISE DE LÍQUIDO SINOVIAL ()

16 - DIAGNÓSTICO / RESUMO: _____