EDIVALDO APARECIDO NUNES MARTINS

Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do *talus* de eqüinos

**São Paulo
2010**

EDIVALDO APARECIDO NUNES MARTINS

Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do *talus* de eqüinos

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.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2255
FMVZ

Martins, Edivaldo Aparecido Nunes

Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do *talus* de eqüinos / Edivaldo Aparecido Nunes Martins. -- 2010.
153 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. Equinos. 2. Quitosana. 3. Osteoartrite. 4. Biomateriais. 5. Cartilagem. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da biocompatibilidade do gel da quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do talus de eqüinos", protocolado sob o nº1245/2007, utilizando 06 (seis) 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 "Study of chitosan-glycerol phosphate gel biocompatibility in experimentally induced equine talus osteochondral defect", protocol number 1245/2008, utilizing 06 (six) 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, 03 de março de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARTINS, Edivaldo Aparecido Nunes

Título: Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do *talus* de eqüinos

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

***À minha esposa Maria Fernanda, pela compreensão, companheirismo e
dedicação.
Juntos cumprimos mais esta etapa.***

***Aos meus pais, Sebastião e Maria.
Fonte de incentivo, força e fé.***

***Aos meus irmãos Rosely, Edson, Edgard, Eduardo e Ana Carolina.
Perto ou longe, continuam comigo.***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Claudio Lopes Correia da Silva, por compartilhar seus conhecimentos, pela amizade e orientação.

À Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, por orientar, acreditar e dedicar arduamente na elaboração e execução deste trabalho.

Às Profas. Dra. Maria Gabriela e Dra. Lucia Mei, pela colaboração e por acreditarem nesta parceria.

À Profa. Dra. Yara Michelacci, pelas idéias e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos professores, Dr. André Luís do Valle de Zoppa, Dr. Steffano Hagen, Dr. Wilson Roberto Fernandes, Dra. Carla Belli, Dra. Aline Ambrósio, Dra. Denise Tabachi Fantoni e Dra. Silvia Gaido Cortopassi, pelo incentivo e por compartilharem seus conhecimentos.

Aos coordenadores dos cursos de Medicina Veterinária, Prof. Dr. Luciano (Unicastelo), Prof. Dra. Lucia (Instituição Moura Lacerda), e Prof. MSc Karina (Anhanguera), por compreenderem minhas ausências e me apoiarem durante a realização do doutorado.

Aos professores da Unicastelo, Instituição Moura Lacerda e da Anhanguera, por me substituir no período de aula para que eu pudesse realizar minhas atividades da pós-graduação.

Às técnicas dos laboratórios da FMVZ – USP, Maria Helena, Maú, Claudia, Marli, Clara e Dinha, pela paciência e colaboração na realização deste trabalho.

Aos meus sogros, José e Maria Cecília, pelo apoio e incentivo durante esta jornada.

Aos meus amigos Thais, Julio e Gustavo, pela imensa dedicação e ajuda na execução deste trabalho.

Ao tio Rovilson, ao amigo Lizandro Jacomini, à Célia Soares, pela amizade e por me acolherem em São Paulo.

Ao Walmir, Ana Carolina e Maria Clara, por me acolherem em Campinas quando eu estava na meio do caminho.

Aos amigos do Hovet, Cícero, Marcos e Henrique pela ajuda e pelos momentos de descontração.

A todos os pós-graduandos da cirurgia e da clínica de equinos, pelo companheirismo e apoio durante todo o período de pós-graduação.

Aos residentes de 2008, 2009 e 2010, pela amizade e ajuda durante o período experimental.

Aos funcionários do Hovet, pela colaboração na manutenção dos animais durante o experimento.

Aos eqüinos utilizados neste experimento, Alazão, M22, Tordilho, M16, Castanho, Cinco e o Pequeno.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento da pesquisa.

À todos que ajudaram direta ou indiretamente, e torceram por mim nesse período.

RESUMO

MARTINS, E. A. N. **Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do *talus* de eqüinos.** [Study of chitosan - glycerol phosphate gel biocompatibility in experimentally induced equine talus osteochondral defect]. 2010. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os estudos na área de engenharia de tecidos aplicada à reparação da cartilagem articular estão voltados ao desenvolvimento de uma matriz biocompatível que permita a diferenciação, proliferação e manutenção de células para produção de cartilagem hialina. A quitosana é um biomaterial e vem sendo estudada como suporte para condrócitos e para liberação controlada de substâncias. O objetivo deste trabalho foi estudar a biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do *talus* de eqüinos. Foram utilizados cinco cavalos da raça Mangalarga, de três anos de idade, e por artroscopia foi criado um defeito osteocondral na tróclea lateral do *talus* de cada articulação. De forma aleatória um defeito foi escolhido para implante do gel de quitosana - fosfato de glicerol, e o defeito da articulação contralateral foi mantido vazio, servindo como controle. Para acompanhamento da evolução do processo de reparação da cartilagem articular foram realizados os exames físico, radiográfico e ultrassonográfico; análise do líquido sinovial (física, celularidade, quantificação de proteína, condroitim sulfato e ácido hialurônico); e análise da cartilagem articular (histológica e produção de proteoglicanos). Os resultados obtidos de todas as avaliações realizadas foram semelhantes entre os defeitos tratados e controle. O gel de quitosana – fosfato de glicerol é biocompatível com o ambiente articular e pode ser indicado para futuras aplicações como suporte de células e para liberação controlada de medicamentos.

Palavras - chave: Quitosana. Reparação de cartilagem. Defeito osteocondral. Biomaterial. Osteoartrite.

ABSTRACT

MARTINS, E. A. N. **Study of chitosan - glycerol phosphate gel biocompatibility in experimentally induced equine talus osteochondral defect.** [Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do *talus* de eqüinos]. 2010. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The tissue engineering studies applied to articular cartilage repair are focused on the development of scaffold biocompatibility allowing the differentiation, proliferation and cells maintenance providing production of the hyaline cartilage. Chitosan is a biomaterial that has been evaluated as a scaffold for chondrocyts implant and also as a drug-delivery control material. The aim of this work was to evaluate the chitosan glycerol phosphate gel biocompatibility in experimentally induced equine talus osteochondral defect. Five three years old Mangalarga breed horses were submitted to arthroscopy for osteochondral defect production on the lateral troclea of the talus in both tibiotarsal joints by arthroscopy. In a random form one defect was chosen for chitosan-glycerol phosphate gel implant, and the defect of the opposed joint was kept empty and used as a control. For the assessment of the articular cartilage repair process was performed the physic, radiographic and ultrasonographic exams; the synovial fluid analyze (physic, cellularity, protein quantification, chondroitin sulphate and hialuronan); and the articular cartilage analyze (hystologic and proteoglicans production). The results obtained in all evaluations performed were similar between the treated and control defects. The chitosan – glycerol phosphate gel is biocompatible with the articular environment and can be indicate for future applications as an scaffold for cells support and drug-delivery control system.

Key-words: Chitosan. Cartilage repair. Osteochondral defect. Biomaterial. Osteoarthritis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem ultrassonográfica do local de aferição da área do recesso medial (traçado contínuo) e da área com conteúdo anecóico (traçado pontado).	55
Figura 2 – Imagem artroscópica demonstrando a colheita de cartilagem para biópsia (cavalo 5).....	59
Figura 3 – Imagem artroscópica durante a realização do defeito osteocondral com auxílio de <i>shaver</i> , na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (Cavalo 1).....	59
Figura 4 – Imagem artroscópica do defeito osteocondral preenchido com o gel de quitosana - fosfato de glicerol. (Cavalo 1)	60
Figura 5 – Imagem fotográfica demonstrando o gel de quitosana associado ao fosfato de glicerol momentos antes da implantação no defeito osteocondral.....	61
Figura 6 – Imagens radiográficas demonstrando o defeito osteocondral com diminuição de tamanho e radiotransparência no decorrer do período experimental. (A) 7 dpo; (B) 60 dpo; (C) dia 120 dpo; (D) 180 dpo.	76
Figura 7 – Imagens ultrassonográficas do recesso medial do cavalo 1 demonstrando (A) conteúdo anecóico no pré-operatório; (B) e substância amorfa em grande quantidade no exame do dia 21 dpo. A área interna do traçado pontado representa o fluido sinovial, e a área entre os traçados representa as vilosidades sinoviais e fibrina.....	84
Figura 8 – Imagens ultrassonográficas do defeito osteocondral do cavalo 3, limitado pelo traçado pontado. (A) nota-se característica heterogênea hipocóica no dia 7 dpo, e (B) heterogênea hiperecólica aos 180 dias dpo.	84
Figura 9 – Imagens artroscópicas demonstrando preenchimento com tecido de reparação após 180 dias da criação do defeito. (A) tecido viloso (cavalo 3 controle); (B) tecido mais compacto, com poucas vilosidades (cavalo 3 tratado)	87
Figura 10 – A: Eletroforese em gel de agarose. B: Radioautograma de ³⁵ S-proteoglicanos derivados da cartilagem articular do cavalo 5 (dia 0). P: padrão de GAGs contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS), 5µg cada; M: proteoglicano presente no meio de cultura; T: ³⁵ S-proteoglicano sintetizado pelo tecido em 24h - São Paulo – 2009	102

Figura 11 – A: Eletroforese em gel de agarose. B: Radioautograma de ^{35}S -proteoglicanos derivados da cartilagem articular do cavalo 5 (dia 180 do pós-operatório). P: padrão de GAGs contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS), 5 μg cada; M: proteoglicano presente no meio de cultura; T: ^{35}S -proteoglicano sintetizado pelo tecido em 24h - São Paulo – 2009.....103

Figura 12 – Fotomicrografia de biopsia de cartilagem articular do cavalo 3 antes e após o implante do gel de quitosana fosfato de glicerol. (A) antes do implante, mostrando cartilagem hialina sem alterações; (B) após o implante, mostrando material amorfo contendo células com características morfológicas fibroblastóides com núcleos arredondados imersos em matriz extracelular (H&E, barra = 100 μm).....104

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Representação gráfica das medianas obtidas da graduação da claudicação de membros pélvicos, de cinco cavalos, após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo – 2009 70
- Gráfico 2 – Representação gráfica dos valores médios da circunferência (cm) da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo, 2010. 71
- Gráfico 3 - Representação gráfica das medianas do escore de avaliação radiográfica da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo – 2009 73
- Gráfico 4 - Representação gráfica da área (cm²) do defeito osteocondral da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame radiográfico após realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo – 2009 75
- Gráfico 5 – Representação gráfica dos valores médios da área total (AT) (cm²) e da área com conteúdo anecóico (AA) (cm²) do recesso medial da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo – 2009. 80
- Gráfico 6 – Representação gráfica dos valores médios da área (cm²) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (tratado e controle) - São Paulo - 2010. 82
- Gráfico 7 – Representação gráfica dos valores médios da área (cm²) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção transversal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (tratado e controle) - São Paulo – 2009 83

Gráfico 8 – Valores médios do fibrinogênio plasmático obtidos em diferentes momentos, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> - São Paulo – 2009.....	89
Gráfico 9 – Representação gráfica das medianas dos escores do aspecto do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo, 2010.	91
Gráfico 10 – Representação gráfica das medianas dos escores da coloração do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo – 2009	92
Gráfico 11 – Representação gráfica das medianas dos escores do grau de viscosidade do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo – 2009	94
Gráfico 12 – Representação gráfica dos valores médios da contagem global de células (células/ μ l) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo, 2010.	95
Gráfico 13 – Representação gráfica dos valores médios dos níveis de proteína plasmática e do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo - 2009.	97
Gráfico 14 – Representação gráfica dos valores médios de ácido hialurônico (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> de ambos os membros (tratado e controle) - São Paulo – 2009	98
Gráfico 15 – Representação gráfica dos valores médios dos níveis de condroitim sulfato (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> de ambos os membros (tratado e controle) - São Paulo – 2009.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medianas da graduação da claudicação de membros pélvicos, de cinco cavalos, obtidos após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo - 2009.	69
Tabela 2 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da circunferência (cm linear) da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo - 2009.	71
Tabela 3 – Medianas obtidas em diferentes momentos do escore de avaliação radiográfica da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo - 2009.	73
Tabela 4 - Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm ²) do defeito osteocondral da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame radiográfico após realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo – 2009.	74
Tabela 5 - Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área total (cm ²) do recesso medial da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo - 2009.	79
Tabela 6 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm ²) com conteúdo anecóico do recesso medial, da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo - 2009.	80
Tabela 7 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm ²) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo – 2009.	81
Tabela 8 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm ²) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção transversal) antes e	

após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo - 2009.	82
Tabela 9 – Medianas dos escores do aspecto do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo - 2009.	90
Tabela 10 – Medianas dos escores da coloração do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo – 2009.....	92
Tabela 11 – Medianas dos escores do grau de viscosidade do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo – 2009.....	93
Tabela 12 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da contagem global de células (células/ μ l) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> e implante de gel QFG (tratado e controle) - São Paulo - 2009.....	95
Tabela 13 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de proteína plasmática e do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo – 2009.....	96
Tabela 14 - Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de ácido hialurônico (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo - 2010.....	98
Tabela 15 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de condroitim sulfato (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado e controle) - São Paulo - 2009.....	99
Tabela 16 – Valores de proteoglicanos (μ g) extraídos do tecido e 35 S-PG (cpm) produzido em 24 horas, dos fragmentos cartilagíneos coletados por artroscopia de cinco cavalos nos dia 0 e 180 (tratado) - São Paulo - 2009.....	101

Tabela 17 – Valores de proteoglicanos (µg) extraídos do tecido e ³⁵S-PG (cpm) produzido em 24 horas, dos fragmentos cartilagíneos coletados por artroscopia de cinco cavalos nos dia 0 e 180 (controle) - São Paulo, 2009.....101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Identificação das articulações tratada e controle, e volume utilizado do gel de QFG, em cinco cavalos, após realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> de ambos os membros – São Paulo - 2009.	56
Quadro 2 – Critérios utilizados para descrição dos achados artroscópicos da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, após 180 dias da realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> de ambos os membros (controle e tratado) – São Paulo - 2009.	60
Quadro 3 – Avaliação radiográfica, na projeção dorsomedial-plantarolateral, das bordas de defeitos osteocondrais criados na tróclea lateral do talus, de cinco cavalos (grupo tratado) - São Paulo - 2009.	77
Quadro 4 – Avaliação radiográfica, na projeção dorsomedial-plantarolateral, das bordas de defeitos osteocondrais criados na tróclea lateral do talus, de cinco cavalos (grupo controle) - São Paulo, 2010.	77
Quadro 5 – Avaliação radiográfica, na projeção dorsomedial-plantarolateral, da característica de preenchimento dos defeitos osteocondrais criados na tróclea lateral do talus, de cinco cavalos (grupo tratado) - São Paulo, 2010.	78
Quadro 6 – Avaliação radiográfica, na projeção dorsomedial-plantarolateral, da característica de preenchimento dos defeitos osteocondrais criados na tróclea lateral do talus, de cinco cavalos (grupo tratado) - São Paulo - 2009.	78
Quadro 7 – Frequência de achados obtidos durante exame ultrassonográfico da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (tratado) - São Paulo - 2009	84
Quadro 8 – Frequência de achados obtidos durante exame ultrassonográfico da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> (controle) - São Paulo - 2009.	85
Quadro 9 – Descrição das alterações encontradas durante artroscopia nas articulações tibiotársicas, de cinco cavalos, após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do <i>talus</i> de ambos os membros (tratado e controle) - São Paulo - 2009.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
µl	microlitro
AH	ácido hialurônico
AIE	anti-inflamatórios esteróides
AINE	anti-inflamatórios não esteróides
Arg	arginina
Asp	aspartato
BMP	proteína morfogenética óssea
cetavlon	brometo de cetiltrimetilamônio
CMCTS	carboximetilquitosana
cpm	centilações por minuto
CS	condroitim sulfato
CSA	condroitin sulfato A
d.m.s	diferença mínima significativa
EDTA	ácido dietilenodiaminotetracético
EGG	éter-gliceril-guaiacol
ESCA	espectroscopia eletrônica para análise química
FGFs	fatores de crescimento fibroblástico
GAGs	glicosaminoglicanos
Gly	glicina
IGF -1 e 2	fatores de crescimento símile à insulina 1 e 2
kDa	quiloDaltons
kg	quilogramas
M	molar
mg	miligrama
ml	mililitro
MMP -1 e -3	metaloproteinase da matriz 1 e 3
° C	graus Celsius
PEO	óxido de polietileno
PGA	ácido-poliglicólico

PGs	proteoglicanos
PLLA	ácido polilático
PLLA	poli (ácido láctico-L)
PMNs	polimorfonucleares
QFG	quitosana fosfato de glicerol
rpm	rotação por minuto
TAT	trombina-antitrombina
TGF – β	fator de crescimento transformante – beta
TIMP-1	inibidor tecidual da metaloproteinase -1
tPA	tecido recombinante ativador de plasminogênio
Tris-HCl	tampão Tris (hidroximetil)-aminometano – ácido clorídrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1 CARTILAGEM ARTICULAR.....	29
2.2 AFECÇÕES ARTICULARES - CARTILAGEM E OSSO SUBCONDRA.....	31
2.3 FORMAS DE TRATAMENTO DAS AFECÇÕES ARTICULARES	33
2.4 BIOMATERIAIS.....	34
2.5 QUITOSANA	36
3 JUSTIFICATIVA.....	49
4 OBJETIVOS	50
4.1 OBJETIVO GERAL	50
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
5.1 ANIMAIS	51
5.2 EXAME FÍSICO.....	51
5.3 EXAME RADIOGRÁFICO	52
5.4 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO	54
5.5 PROCEDIMENTO ARTROSCÓPICO	55
5.5.1 Preparo do animal e técnica anestésica.....	57
5.5.2 Técnica cirúrgica	57
5.6 PREPARO DO GEL À BASE DE QUITOSANA E FOSFATO DE GLICEROL	61
5.7 COLHEITA DE SANGUE.....	62
5.7.1 Análise do Fibrinogênio Plasmático.....	62
5.7.2 Análise da Proteína Plasmática.....	62
5.8 EXAME DO LÍQUIDO SINOVIAL.....	62
5.8.1 Análise física do líquido sinovial	63
5.8.2 Contagem global e diferencial das células do líquido sinovial.....	63
5.8.3 Dosagem da proteína total do líquido sinovial	64
5.8.4 Quantificação do Condroitim Sulfato e Ácido Hialurônico (Extração dos GAGs do líquido sinovial)	64

5.8.4.1 Identificação dos GAGs do líquido sinovial (Condroitim Sulfato e Ácido Hialurônico).....	64
5.9 ANÁLISE DA CARTILAGEM ARTICULAR.....	65
5.9.1 Análise de proteoglicanos.....	65
5.9.1.1 Marcação metabólica dos proteoglicanos de cartilagem articular com ³⁵ S-Sulfato.....	65
5.9.1.2 Extração de proteoglicanos da cartilagem articular.....	66
5.9.1.3 Identificação e quantificação de proteoglicanos.....	66
5.9.1.3.1 Eletroforese em gel de agarose.....	66
5.9.1.3.2 Proteoglicanos marcados com ³⁵ S- Sulfato.....	67
5.10 ANÁLISE MORFOLÓGICA / HISTOLOGIA.....	67
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
6 RESULTADOS.....	69
6.1 EXAME FÍSICO.....	69
6.1.1 Graduação da claudicação.....	69
6.1.2 Mensuração da circunferência articular.....	70
6.2 EXAME RADIOGRÁFICO.....	72
6.3 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO.....	79
6.3.1 Mensuração do recesso medial da articulação tibiotarsometatársica.....	79
6.3.2 Mensuração da área do defeito osteocondral.....	81
6.3.3 Descrição dos achados ultrassonográficos.....	83
6.4 EXAME ARTROSCÓPICO.....	85
6.5 ANÁLISE DO FIBRINO GÊNIO.....	88
6.6 ANÁLISE FÍSICA DO LÍQUIDO SINOVIAL.....	89
6.6.1 Aspecto.....	89
6.6.2 Coloração.....	90
6.6.3 Viscosidade.....	92
6.6.4 Contagem global e diferencial das células do líquido sinovial.....	93
6.6.5 Dosagem da proteína do líquido sinovial e plasmática total.....	95
6.6.6 Quantificação do Ácido Hialurônico e Condroitim Sulfato do líquido sinovial.....	96

6.7 ANÁLISE DA CARTILAGEM ARTICULAR.....	99
6.7.1 Quantificação de proteoglicanos	99
6.7.2 Análise Morfológica / Histologia	103
7 DISCUSSÃO	104
7.1 EXAME FÍSICO.....	104
7.2 EXAME RADIOGRÁFICO	106
7.3 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO	107
7.4 EXAME ARTROSCÓPICO	109
7.5 EXAME HISTOLÓGICO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DA CARTILAGEM.....	111
7.6 LÍQUIDO SINOVIAL.....	112
8 CONCLUSÃO	118
REFERÊNCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

As desordens do sistema músculo-esquelético dos eqüinos acarretam prejuízos três vezes maiores quando comparado a outros sistemas, e dentre essas afecções, os problemas articulares estão em primeiro lugar e causam as maiores perdas funcionais, como tem sido observado em cavalos de corrida e em diversas populações de eqüinos (ROSSDALE et al., 1985).

A osteoartrite no cavalo é caracterizada por degeneração da cartilagem articular, esclerose do osso subcondral, necrose óssea, osteófitos marginais, e inflamação da membrana sinovial, cápsula e ligamentos. A reação pode se apresentar desde uma leve sinovite até a doença articular degenerativa. A osteoartrite ocorre mais comumente nas articulações do carpo, boleto e tarso. Comumente, outras afecções articulares como a osteocondrite dissecante e as artrites traumáticas ou sépticas podem levar à osteoartrite, quer por instabilidade articular, destruição da cartilagem ou interferência entre as superfícies de contato (SKIÖLDEBRAND et al., 2009).

Para minimizar os efeitos deletérios à articulação, muitas formas de tratamento estão disponíveis, como o uso de anti-inflamatórios esteróides (AIE) e não esteróides (AINE), substâncias condroprotetoras, como condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico), além das cirurgias articulares (McILWRAITH, 1996). Na medicina humana, tem-se usado medicamentos anti-citocinas ou anti-catabólicos (VAN DEN BERG, 2001). Entretanto, a maioria dos tratamentos objetivam a inibição da degradação articular.

Para reparação dos defeitos osteocondrais e osteoartrite, nas últimas décadas têm-se estudado os efeitos dos fatores de crescimento anabólicos com grande enfoque para o IGF-I. Inclui-se nestes estudos, os tecidos alógenos ou autógenos, além das células-tronco mesenquimais como fonte expressiva para melhoria da qualidade da cicatrização da cartilagem (WORSTER et al., 2001).

Além dos tecidos e substâncias a serem implantadas para auxiliar na reparação da cartilagem articular, é necessária a utilização de compostos que desempenhem a função de suporte e que possam ser manipulados de acordo com as reações físicas e químicas exigidas no leito a ser implantado, e para isso a engenharia de tecidos tem obtido avanços significativos. Observamos em vários

trabalhos de pesquisa o uso de substâncias biológicas e de polímeros para preenchimento do defeito osteocondral, suporte para células e para liberação controlada de substâncias em articulações de eqüinos, demonstrando resultados variáveis de acordo com o material utilizado.

A quitosana tem chamado atenção devido a vários estudos terem demonstrado sua potencial aplicação nas áreas médica e farmacêutica. Uma vantagem dessa utilização está na disponibilidade da quitosana na natureza através da quitina, podendo ser facilmente encontrada, como subproduto da indústria pesqueira (TORRES et al., 2005).

Tendo em vista o crescente número de trabalhos de pesquisa utilizando a quitosana como suporte para células e para liberação controlada de substâncias em diferentes modelos experimentais, e a ausência de trabalhos utilizando a quitosana para reparação de defeitos osteocondrais em eqüinos, ressaltamos a importância deste trabalho de pesquisa, primeiramente para conhecermos a biocompatibilidade da substância no ambiente articular, abrindo, posteriormente, uma ampla área para desenvolvimento de pesquisas e aplicação dos resultados nesta espécie, passando para a associação de substâncias a esse biomaterial.

Neste trabalho experimental foram criados, via artroscopia, defeitos osteocondrais na tróclea lateral do talus de ambos os membros, em cinco cavalos. Em uma articulação foi utilizado o gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para preenchimento do defeito, e na articulação contralateral o defeito não recebeu tratamento, servindo como controle. Para avaliar a biocompatibilidade do gel, foi utilizado o exame radiográfico, ultrassonográfico, a dosagem de proteína e fibrinogênio plasmáticos, a dosagem de proteína, condroitim sulfato e ácido hialurônico do líquido sinovial, a produção de proteoglicanos pela cartilagem articular, bem como a análise histomorfológica da cartilagem articular.

Para realização deste trabalho experimental, colaboraram pesquisadores do Departamento de Clínica Médica, Departamento de Cirurgia e Departamento de Patologia da FMVZ-USP, Departamento de Bioquímica da UNIFESP e Departamento de Tecnologia de Polímeros FEQ – UNICAMP e UNIFAL.

Os exames radiográficos e ultrassonográficos foram realizados pelo Serviço de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP.

As artroscopias foram realizadas no Centro Cirúrgico do Serviço de Cirurgia de Grandes Animais da FMVZ-USP.

O gel a base de quitosana e fosfato de glicerol foi preparado no laboratório de polímeros da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

As dosagens de proteína total e fibrinogênio plasmáticos, bem como a dosagem de proteína do líquido sinovial foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

As dosagens de condroitim sulfato e ácido hialurônico, bem como a análise de proteoglicanos foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP.

Para análise morfológica da cartilagem articular, as amostras foram processadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão, serão abordados os aspectos morfológicos e funcionais da cartilagem articular, bem como as principais afecções que as acometem; as diferentes formas de tratamento e as perspectivas do uso de novas substâncias. Por fim, tratar-se-á das características da quitosana, visando sua aplicação nos defeitos osteocondrais como uma possível alternativa de associação a outras substâncias que auxiliam na regeneração da cartilagem.

2.1 CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular adulta está arranjada estruturalmente em quatro zonas: a superficial, intermediária, profunda e calcificada (PALMER; BERTONE, 1994). A maior quantidade de colágeno está na zona superficial, com fibras orientadas paralelamente à superfície. Essa quantidade de colágeno diminui conforme se distancia da superfície, enquanto o conteúdo de proteoglicanos apresenta tendência oposta (POOLE et al., 1982).

A água extracelular é mais concentrada na camada superficial, contribuindo para lubrificação e absorção de carga através da exsudação de fluido dentro do espaço sinovial. Os condrócitos da camada superficial são ovais e orientados paralelamente à superfície (POOLE et al., 1982).

Na camada intermediária existem grandes condrócitos, isolados ou pareados em lacunas, e orientados aleatoriamente. O conteúdo de proteoglicanos (PGs) na camada intermediária é maior do que na camada superficial e tem uma rede de fibrilas de colágeno orientada obliquamente (SKIÖLDEBRAND, et al. 2009).

Já a camada profunda é caracterizada por condrócitos circulares freqüentemente arranjos em colunas verticais separadas por fibrilas colágenas alinhadas radialmente, com elevado conteúdo de proteoglicanos. A camada mais basal é mineralizada e separada da cartilagem não-mineralizada por uma diferente e fina camada calcificada, conhecida como “tidemark”. Cada camada tem uma diferente capacidade biomecânica devido às diferentes composições bioquímicas e

arranjos de fibras de colágeno (SKIÖLDEBRAND et al., 2009).

A organização estrutural delicada da matriz extracelular pode ser dividida em diferentes compartimentos: o pericelular, territorial e interterritorial. A matriz pericelular, fechada para cada célula (lacuna), contém moléculas interagindo com a membrana superficial das células promovendo o “feedback” da matriz. A matriz territorial, ou capsular, está ao redor das células ou grupos de células, com moléculas regulando os estágios iniciais da organização da matriz. A matriz interterritorial é o compartimento mais abundante. A maior função da matriz extracelular é promover a capacidade biomecânica única da cartilagem articular (SKIÖLDEBRAND et al., 2009).

Nos animais, a cartilagem articular é do tipo hialina, e o colágeno tipo II é o componente mais predominante (90-95%), com presença de outros tipos de colágenos em diferentes quantidades (tipo VI, IX, X e XI) (McILWRAITH, 2002). O colágeno tipo II é sintetizado e secretado por condrócitos como molécula de pró-colágeno, que contém extensões de propeptídeos não helicoidais com terminações amino e carboxi. A clivagem extracelular dessas extensões proporciona a conversão do pró-colágeno a colágeno. A molécula tipo II consiste de três cadeias alfas idênticas que estão torcidas dentro de uma tripla hélice para direita. Ligações cruzadas ocorrem dentro da mesma molécula de colágeno, e entre as moléculas de colágeno vizinhas dentro da fibrila de colágeno ou das fibrilas adjacentes. As fibrilas de colágeno formam uma rede tri-dimensional (McILWRAITH, 2005).

Dentro desta rede estão agregados de PGs e ácido hialurônico (AH) em forma de arco, dando a característica rígida à cartilagem articular. Os PGs da cartilagem articular estão misturados dentro da armação de colágeno. Na cartilagem madura, muitos dos PGs são monômeros de agrecan, agregados em associação com o AH através de proteínas ligantes para formar agregados macromoleculares. Mais de 30 cadeias locais de queratam sulfato (KS) e 100 cadeias de condroitim sulfato (CS) podem estar ligadas ao centro da proteína de um único monômero de PG entre os domínios G2 e G3. Na cartilagem articular normal, os PGs são ativamente modificados (turnover), resultando em um equilíbrio entre síntese por condrócitos e quebra por proteinases extracelulares, e são influenciados por citocinas (McILWRAITH, 2005).

Os maiores GAGs encontrados na cartilagem são o condroitin 4 - sulfato, condroitin 6 - sulfato, o queratam sulfato e o AH. Eles consistem de uma cadeia

linear longa e unidades dissacarídicas repetidas de hexosamina (glucosamina ou galactosamina) alternando com outros resíduos de açúcar (ácido glucurônico, ácido idurônico, ou galactose). A proporção de cada GAG varia com o tipo e idade da cartilagem (PLATT, 1996).

O CS é o maior GAG do agregam e possui uma cadeia com um peso molecular de 15000 a 25000 daltons, consistindo de subunidades dissacarídicas de ácido glucurônico [$\beta(1-3)$] e N-acetilgalactosamina [$\beta(1-4)$]. A substituição do grupo sulfato pode ocorrer na posição C4 ou C6 para formar o condroitin 4 - sulfato ou condroitin 6 - sulfato, mas o modelo de sulfatação dos dissacarídeos que compõem a cadeia de CS não é uniforme ao longo de seu comprimento. Entre 100 e 150 cadeias de condroitim sulfato estão unidas na extensão do domínio da proteína central (PLATT, 1996). O CS pode ser utilizado como biomarcador da síntese de agregam, e alguns epitopos podem ser quantificados no fluido sinovial, tais como CS - 846, o 3 - B - 3, e o 7 - D - 4 (McILWRAITH, 2005).

O AH possui uma cadeia oblíqua e constitui o tecido conectivo da matriz extracelular. As moléculas de AH são longas, não ramificadas, e moléculas não sulfatadas, consistindo de 200 a 10000 unidades dissacarídeas repetida de ácido glucurônico ligados ao $\beta(1-3)$ ao N-acetilgalactosamina, com massa molecular de 1×10^5 a 1×10^6 kDa. O AH corresponde a uma pequena percentagem de GAGs na cartilagem, mas desempenha função especial como espinha dorsal do agregado de proteoglicano. A interação do proteoglicano com o HA é estabilizada por uma proteína, a proteína ligante, que liga o AH ao centro da proteína do PG. O ácido hialurônico é o único glicosaminoglicano não sulfatado (PLATT, 1996).

2.2 AFECÇÕES ARTICULARES - CARTILAGEM E OSSO SUBCONDRAIS

A osteoartrite são alterações articulares degenerativas caracterizadas por uma destruição variável da cartilagem articular, freqüentemente acompanhada por esclerose do osso subcondral e formação de osteófitos. Sinovite e hidroartrose podem ocasionalmente estar associada com a doença clinicamente caracterizada por dor e disfunção da articulação acometida (DORNA; GUERRERO, 1998). A alta incidência de osteoartrite é devido, em parte, à mínima capacidade de cicatrização

intrínseca da cartilagem articular lesionada (WORSTER et al., 2001). A cartilagem articular, que é formada de cartilagem hialina madura, não possui vasos, e as células para reparação não podem ser recrutadas. Existem limites para a divisão potencial das células da cartilagem e sua habilidade para ser reparada. Portanto, torna-se difícil tratar a osteoartrite quando há progressão e a cartilagem articular degenera (INOUE et al., 2006).

A osteocondrose faz parte da doença ortopédica do desenvolvimento e ocorre em várias raças. A osteocondrite dissecante (OCD) e os cistos ósseos subcondrais são manifestações da osteocondrose. A lesão primária da osteocondrose é considerada por ocorrer dentro da cartilagem de crescimento e está associada com anormalidades no processo de ossificação endocondral e retenção da cartilagem (HENSON et al., 1997).

Durante a ossificação endocondral, os condrócitos passam por um complexo processo de proliferação, diferenciação e maturação antes da produção de matriz extracelular mineralizada. Estes condrócitos são caracterizados por marcadas alterações no fenótipo e nos produtos das proteínas produzidas por eles. A diferença entre a taxa de proliferação dos condrócitos, o tamanho do “pool” celular proliferativo e sua taxa de diferenciação controlam o aumento do número de células nesta rede. Esta mudança reflete o balanço do estímulo mitogênico e o processo passa por perda das células da população proliferativa, ou seja, diferenciação e apoptose (HENSON et al., 1997).

O tamanho do “pool” proliferativo e do tempo do ciclo celular varia com o estágio de desenvolvimento do animal e são controlados por um número de agentes reguladores, tanto sistêmicos como locais. Várias famílias de fatores de crescimento e seus receptores são conhecidos por terem uma importante função no controle do crescimento e diferenciação de condrócitos (HENSON et al, 1997).

Sistemicamente, o hormônio de crescimento, a insulina, o hormônio da tireóide e o hormônio da paratireóide são importantes. Localmente, estão envolvidos os fatores de crescimento símile à insulina I e II (IGF-I e II), fatores de crescimento fibroblástico (FGFs), os fatores de crescimento transformante – beta (TGF- β), e as proteínas morfogenéticas do osso. São atribuídas às alterações no controle de alguns destes fatores e seus mecanismos de transdução de sinal, a quebra da seqüência do crescimento e maturação dos condrócitos (HENSON et al., 1997).

2.3 FORMAS DE TRATAMENTO DAS AFECÇÕES ARTICULARES

Para minimizar os efeitos deletérios à articulação, muitas formas de tratamento estão disponíveis, como o uso de anti-inflamatórios esteróides (AIE) e não esteróides (AINE), substâncias condroprotetoras como condroitim sulfato, glucosamina e ácido hialurônico, além das cirurgias articulares (McILWRAITH, 1996). A glucosamina e o condroitim sulfato são substâncias encontradas em suplementos articulares nutracêuticos que podem ser efetivos na prevenção ou tratamento da osteoartrite. Têm sido atribuído por vários autores como agentes estimulantes do metabolismo da cartilagem e inibidores da degradação da matriz. Segundo Dechant et al. (2005) o uso em conjunto das duas substâncias pode ser vantajoso no tratamento das osteoartrites.

Na medicina humana tem-se usado medicamentos anti-citocinas ou anti-catabólicos visando à inibição da degradação articular (VAN DEN BERG, 2001). Nas últimas décadas têm-se estudado os efeitos dos fatores de crescimento anabólicos na recuperação da cartilagem articular lesionada e no tratamento da osteoartrite, com grande enfoque para o IGF-1. Ao IGF-1 são atribuídos efeitos anabólicos, incluindo aumento da síntese de moléculas de agrecan e de colágeno tipo II, além de aliviar os efeitos degradativos de citocinas na matriz (FORTIER et al., 2004).

Tem ocorrido um progresso significativo na melhoria da reparação da cartilagem através da transferência de tecidos alógenos ou autógenos, e através de procedimentos de transplante de células livres. A formação de uma nova superfície da cartilagem por transplante de condrócitos autógenos ou alógenos, ou através do uso de células-tronco mesenquimais, apresenta várias vantagens sobre o transplante de tecido sólido ou procedimentos de debridamento local. Entretanto, condrócitos alógenos carregam um risco inerente de reação auto-imune, e, portanto, o uso de condrócitos autógenos evita este risco. A falta de um local doador apropriado e a necessidade de grandes amostras de cartilagem limitam as aplicações de condrócitos autógenos. As células-tronco mesenquimais são células pluripotentes indiferenciadas capazes de diferenciação entre muitos tipos celulares e pode ser uma fonte de célula autógena apropriada para reparação da cartilagem (WORSTER et al., 2001).

Recentemente, o uso de matrizes biológicas ou da engenharia tecidual sintética para a formação de uma nova superfície da cartilagem tem recebido considerável atenção. A aplicação de condrócito criopreservado, amplificado in vitro na elaboração, reduz ou elimina a necessidade de um sítio doador, e o elaborado maleável pode ser aplicado artroscopicamente, melhorando a aceitação pelo paciente. Matrizes biológicas como o hialuronan, esponjas de colágeno tipo II, alginato, agarose e fibrina têm sido usadas in vitro para estudar o metabolismo dos condrócitos, resultando em um extenso “pool” de conhecimento independente da sua função nessas matrizes (FORTIER et al., 2002).

2.4 BIOMATERIAIS

A engenharia tecidual aplicada à reparação da cartilagem articular envolve o isolamento de condrócitos articulares ou de suas células precursoras que podem ser expandidas in vitro e então colocados em uma matriz biocompatível, o chamado scaffold, que serve para o cultivo e subsequente implantação dentro da articulação. Certamente, o tipo de célula usada para engenharia da cartilagem é crítico para resultados em longo prazo. Populações de células diferentes que estão sendo investigadas em estudos experimentais incluem condrócitos articulares maduros, condrócitos epifiseais, células-tronco mesenquimais, células do estroma da medula óssea, e pericondrócitos (FRANCIS SUH; MATTHEW, 2000).

A escolha do material como scaffold também é crítica para o sucesso das abordagens na reparação da cartilagem articular. Uma variedade de materiais, naturais e sintéticos, biodegradáveis e não-biodegradáveis, tem sido estudada como potenciais substâncias carreadoras de células para reparação da cartilagem. Os materiais de ocorrência natural incluem várias formas, com base no colágeno tipo I e II em forma de scaffold, géis, ou géis compostos de colágeno-alginato. Os biomateriais sintéticos baseados em polímero incluem o ácido-poliglicólico (PGA) e ácido polilático (PLLA), ou a mistura destes compostos. Na engenharia de tecido da cartilagem, os copolímeros de PGA, PLLA e PGA-PLLA tem sido estudados quanto à eficácia dos scaffolds em liberar condrócitos in vitro e in vivo. Tem-se observado que algumas substâncias de polímero não degradável, tais como o

politetrafluoroetileno, polimetilmetacrilato, e compostos de hidroxiapatita/dacron, também facilitam a restauração da superfície articular. Porém, segundo Francis Suh e Matthew (2000), é necessária a condução de alguns estudos para avaliar de maneira objetiva os resultados com outros biomateriais para posterior comparação.

A substância carreadora de células ideal deve ser aquela que mimetize o ambiente natural da matriz da cartilagem articular. Os componentes da matriz extracelular da cartilagem, tais como o colágeno tipo II e os glicosaminoglicanos desempenham uma função importante na regulação da expressão do fenótipo condrocítico e no auxílio a condrogênese tanto in vitro como in vivo. Por outro lado, os condrócitos podem sofrer diferenciação e produzir uma matriz fibrocartilaginosa inferior rica em colágeno tipo I. Essa matriz inferior levará, então, à falha na formação da cartilagem hialina. Francis Suh e Matthew (2000) discutem que o critério de escolha do biomaterial na engenharia de tecido da cartilagem inclui compatibilidade biológica e força biomecânica. Estas características podem proporcionar um ambiente apropriado, bioquímico e biomecanicamente, necessário para engenharia celular, buscando a regeneração da cartilagem hialina por longo período no local do defeito.

Schmidt et al. (2006), referindo-se à utilização de materiais sintéticos ou naturais associados a fatores de crescimento, relataram que a escolha dependerá da demanda mecânica do local do defeito e da taxa de degradação requerida. Os materiais naturais tipicamente apresentam a vantagem de promoverem excelente biocompatibilidade e ótimas propriedades na superfície para fixação da célula e desenvolvimento. Mas a habilidade para controlar a carga e liberação do fator de crescimento dos materiais naturais tais como a fibrina, colágeno, ácido hialurônico (HA) e matriz óssea desmineralizada podem ser limitadas por uma sensibilidade destes materiais nas condições de processamento, tão bem como a natureza das interações física e química que ocorrem com os fatores de crescimento. Em contraste, polímeros sintéticos degradáveis, tais como os copolímeros do ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA) usados para ensaios de formação de cartilagem heterotópica, podem oferecer liberação tolerável do fator de crescimento e um perfil de degradação devido à extensa variedade de caminhos pelo qual estes polímeros podem ser processados.

Referindo-se ainda aos materiais para suporte e liberação do fator de crescimento, Schmidt et al. (2006) lembram que os fatores de crescimento são

compostos de proteínas solúveis de massa molecular relativamente pequena e que são rapidamente absorvidos ou degradados. Devido a estas características, a liberação controlada dos fatores de crescimento é necessária para que se tornem disponíveis às células em quantidade e tempo suficiente para se obter valor terapêutico. Entretanto, existem poucos dados disponíveis referentes aos efeitos das cinéticas de liberação. O perfil de liberação máxima é necessário para que se possa escolher, dependendo da função específica daquele fator de crescimento. Por exemplo, pode ser vantajosa a rápida liberação de agentes quimiotáticos na fase inicial do processo de reparação, objetivando recrutar células necessárias para posicionar as substâncias no tecido a ser reparado. Agentes mitogênicos, em contraste, podem necessitar de liberação por um longo período para assegurar que o tecido de reparação preencha adequadamente e amadureça dentro do defeito.

2.5 QUITOSANA

A quitosana é um aminopolissacarídeo biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina. Sua estrutura química é formada pelos copolímeros β -(1 $\rightarrow$ 4)- 2-amino 2-desoxi-D-glicose e β -(1 $\rightarrow$ 4)- 2-acetamida 2-desoxi-D-glicose com a presença de grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário. A quitosana vem sendo estudada como biomaterial de potencial aplicação, principalmente nas áreas médica e farmacêutica. É crescente, também, a importância da quitosana como adsorvente, em processos de recuperação e/ou de purificação de bioprodutos de alto valor agregado, como as proteínas. Uma vantagem dessa utilização está na disponibilidade da quitosana na natureza através da quitina, podendo ser facilmente encontrada como subproduto da indústria pesqueira (TORRES et al., 2005).

Devido à sua natureza policatiónica, quando a quitosana entra em contato com soluções ácidas é possível a sua moldabilidade nas mais diversas formas como membranas, esferas, gel, microesferas, entre outras (TORRES et al., 2005).

Vários trabalhos de pesquisas têm avaliado a resposta do tecido a vários implantes de quitosana. Em geral, estes materiais têm chamado atenção por induzir pouca reação tipo corpo estranho. A formação de tecido de granulação,

freqüentemente com acelerada angiogênese, parece ser de curso típico na cicatrização. Em curto prazo (menos de sete dias), um acúmulo significativo de neutrófilos na vizinhança do implante é observado, ocorrendo rápida dispersão e a não ocorrência de resposta inflamatória crônica. Os efeitos estimulatórios da quitosana e fragmentos da quitosana em células imunológicas podem ter a função na indução local da proliferação celular e da integração do material implantado no tecido hospedeiro (FRANCIS SUH et al., 2000).

Segundo Mattioli-Belmonte et al. (1999) a proteína morfogenética óssea (BMP), associada com N,N-dicarboximetil quitosana, pode ser usada para induzir ou facilitar a reparação das lesões da cartilagem articular. Esta tentativa de associação objetiva a potencialização sinérgica dos efeitos biológicos. Os resultados demonstraram que o BMP-7 aumentou a proliferação, in vivo, das células com expressão fenotípica para condrócitos, levando a cicatrização parcial das lesões da superfície articular. N,N-dicarboximetil quitosana pode ser indicado como carreador molecular ou agente liberador de drogas.

Lu et al. (1999) estudaram os efeitos da quitosana na cartilagem do joelho de ratos, através de injeção de 0,2 ml de uma solução de quitosana a 0,1% (pH 6,9), na cavidade articular. A análise histológica e histomorfométrica foram realizadas após uma, três e seis semanas. Observou-se que após uma e seis semanas o grupo quitosana demonstrou diminuição significativa ($p < 0,005$) da espessura da cartilagem epifiseal, e aumentou significativamente a densidade de condrócitos na cartilagem articular ($P < 0,002$). Após seis semanas da injeção da solução de quitosana houve ligeira proliferação de tecido fibroso com abundante concentração de fibroblastos, fibrócitos e monócitos, sugerindo uma atuação da quitosana no crescimento da cartilagem epifiseal e cicatrização da ferida da cartilagem articular.

Segundo Sechriest et al. (2000), a qualidade da cartilagem articular usando um polímero celular, depende, em parte, da composição química do biomaterial e a capacidade do biomaterial em manter o fenótipo do condrócito. Os autores associaram o condroitin sulfato A (CSA) à quitosana para desenvolver um biomaterial para auxiliar na condrogênese. A quitosana combinada ao CSA polianiónico apresenta ligações iônicas cruzadas, resultando na formação de hidrogel. Quando os condrócitos articulares primários de bovino são cultivados em uma fina camada de quitosana CSA, formam uma discreta e focal adesão à camada e mantém muitas características do fenótipo do condrócito diferenciado, incluindo

morfologia arredondada, limitada mitose, produção de colágeno tipo II, e de proteoglicano. Os autores sugeriram que a quitosana CSA pode ser processada como um material para carrear condrócitos autólogos em um transplante ou como um suporte para a engenharia de tecido cartilágneo.

Chenite et al. (2000) descreveram uma nova abordagem para preparar soluções neutras sensíveis termicamente, baseadas na combinação do sal de quitosana/poliol. Esta formulação possui pH fisiológico e o líquido deve permanecer abaixo da temperatura ambiente para encapsulamento das células e proteínas terapêuticas; os compostos formam géis monolíticos à temperatura corpórea. Quando injetado in vivo, as formulações líquidas tornam-se gel in situ. Este sistema pode ser indicado para liberar fatores de crescimento biologicamente ativos in vivo, e como suporte para condrócitos para reparação de cartilagem. Este estudo reportou o uso das soluções aquosas do sal polímero/poliol como sistema de gel, sugerindo a descoberta de um protótipo para uma nova família de géis termofixantes altamente compatíveis com componentes biológicos.

Cui et al. (2003) investigaram a eficiência de dois tratamentos por poli (ácido láctico-L) (PLLA) com modificação da superfície utilizando a quitosana, por aprisionamento e união pelo uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida. As propriedades dos filmes de PLLA original, aprisionados com quitosana e unidos com filmes de PLLA foram investigados por mensuração do ângulo de contato com a água e espectroscopia eletrônica para análise química (ESCA). O ângulo de contato indicou a mudança na hidrofiliabilidade e os dados da ESCA sugeriram que os filmes de PLLA modificado tornaram-se enriquecidos com átomos de nitrogênio. Para verificar a citocompatibilidade dos filmes de PLLA modificados, condrócitos da articulação de bovinos foram cultivados. Os resultados demonstraram que a quitosana usada para modificar a superfície do PLLA pode aumentar a adesão do condrócito, sua proliferação e função.

Kim et al. (2003) elaborou um tipo de suporte poroso a base de quitosana, contendo TGF- β 1, para aumentar a condrogênese. Primeiramente, para alcançar a liberação controlada de TGF- β 1, microesferas de quitosana carregadas com TGF- β 1 (MS-TGFs) foram preparadas pelo método de emulsão, e de maneira idêntica foram preparadas microesferas carregadas com BSA, uma proteína padrão. Ambas microesferas contendo TGF- β 1 e BSA tinham formatos esféricos com um tamanho variando de 0,2 a 1,5 micron. No experimento de liberação, ambas proteínas foram

lentamente liberadas das microesferas, acima de cinco dias em uma solução de PBS (pH 7,4). A taxa de liberação do TGF- β 1 foi muito menor do que a do BSA. Para verificar a proliferação e diferenciação dos condrócitos, microesferas com e sem TGF- β 1 foram colocadas em um suporte de quitosana poroso, preparado pelo método de congelamento a seco. Constatou-se aumento significativo da proliferação celular e produção da matriz extracelular no meio de cultura que recebeu as microesferas de TGF- β 1. Segundo os autores, o suporte de quitosana associado às microesferas de TGF- β 1 apresentam grande potencial para utilização como implante no tratamento de defeitos de cartilagem.

Lee et al. (2004) desenvolveram um suporte tridimensional composto por colágeno, quitosana e glicosaminoglicano em combinação com microesferas de quitosana carregadas com TGF- β 1, e verificaram o efeito da liberação do TGF- β 1 sobre a proliferação de condrócitos. A liberação controlada do TGF- β 1 foi mensurada pelo método ELISA durante sete dias. As microesferas de TGF- β 1 foram encapsuladas na concentração de 10 ng e então os condrócitos foram cultivados em suportes e incubados in vitro, por três semanas. A taxa de proliferação e a produção de glicosaminoglicanos foram significativamente maiores nos suportes com microesferas incorporadas com TGF- β 1 do que em suportes controle sem as microesferas, além do aumento da matriz extracelular e do colágeno tipo II. Desta forma, os resultados sugeriram que as microesferas de TGF- β 1 apresentavam potencial para aumentar a formação de cartilagem.

Iwasaki et al. (2004) investigaram in vitro a adesão de condrócitos de coelhos em um suporte de alginato e em um suporte de alginato com quitosana. Os autores verificaram que os condrócitos apresentaram maior capacidade de adesão, manutenção das características arredondadas, e densa produção de colágeno tipo II para o suporte híbrido de alginato-base quitosana quando comparado ao suporte de alginato, concluindo que o polímero híbrido alginato-base quitosana demonstrou grande potencial como biomaterial para utilização como suporte.

No estudo de Hsu et al. (2004), uma série de materiais biodegradáveis naturais na forma de complexos de quitosana(C), alginato (A), e hialuronato (H) foram avaliados como suporte. A proporção de C:A foi de 1:1 ou 1:2, e o H correspondeu a 2% da mistura. Para modificar a superfície do suporte ou filme os autores utilizaram uma proteína contendo arginina, glicina e aspartato (Arg-Gly-Asp), uma celulose ligante no domínio – RGD (R). Condrócitos de ratos e de coelhos

foram utilizados para testes de citocompatibilidade. A formação de neocartilagem em suportes foi examinada in vitro e em defeitos articulares de coelhos. Os resultados dos testes de citocompatibilidade demonstraram que R aumenta a união da célula e proliferação nos filmes de complexo A e C-A-H. O complexo C1A1HR (C:A = 1:1 com H e R) apresentou melhor desempenho quando comparado à outra formulação. As células retiveram sua morfologia esférica em todos complexos, C-A e C-A-H. A avaliação in vitro dos suportes indicou que o complexo C1A1HR foi o mais apropriado para cultura 3-D, caracterizado por maior crescimento celular, maior conteúdo de colágeno e glicosaminoglicanos. Quando os suportes com condrócitos foram implantados nos defeitos da cartilagem do joelho de coelho, foi observada reparação parcial após um mês em C1A1HR e C1A1 (C:A=1:1 sem H e R). Quando se utilizou o C1A1HR, os defeitos foram reparados completamente, caracterizando um suporte com uso potencial na reparação da cartilagem articular.

Yamane et al. (2005) investigaram o comportamento de condrócitos de coelhos, in vitro, utilizando como suporte um polímero híbrido de ácido hialurônico e quitosana. Foram formados três grupos, o de polímeros de quitosana (grupo quitosana), e os de ácido hialurônico - quitosana (0,04% e 0,07%). Condrócitos articulares foram isolados de coelhos e cultivados na superfície de cada suporte. Os efeitos de cada composto na adesividade da célula, proliferação, mudanças morfológicas, e síntese de matriz extracelular foram analisadas pelo teste de união quantitativa da célula, quantificação de DNA, microscopia eletrônica de varredura e luz, RT-PCR semi-quantitativo, e análise imunoistoquímica. Adesividade celular, proliferação e síntese de agregan estavam significativamente altas nos grupos quitosana - ácido hialurônico 0,04% e 0,07%, quando comparado ao grupo quitosana. Na microscopia eletrônica de varredura foi observado nos grupos quitosana - ácido hialurônico a proliferação de condrócitos, que mantinham fenótipo morfológico e com síntese de matriz extracelular ao redor. A coloração imunohistoquímica com anticorpo anti-colágeno tipo II demonstrou rica produção de colágeno tipo II na matriz pericelular dos condrócitos. Desta forma, constatou-se que o composto ácido hialurônico - quitosana apresentou grande potencial para utilização como biomaterial.

Liu et al. (2005) avaliaram os efeitos da injeção intra-articular de carboximetilquitosana (CMCTS) na expressão do mRNA da metaloproteinase da matriz - 1, e -3 (MMP -1,-3), e o inibidor de tecido da metaloproteinase -1 (TIMP-1)

na cartilagem osteoartrítica. Trinta e dois coelhos foram submetidos a transecção do ligamento cruzado anterior, unilateral (ACLT), e após cinco semanas foram divididos aleatoriamente em quatro grupos. Coelhos do grupo A receberam 0,3 ml de injeção intra-articular a 2% de CMCTS de alto peso molecular, duas vezes na semana. Coelhos do grupo B foram tratados sobre a mesma condição usando CMCTS 2% de baixo peso molecular. Os coelhos do grupo C receberam 0,3 ml de injeção intra-articular de hialuronato de sódio a 1% (HA), uma vez na semana. Animais do grupo D não receberam tratamento e serviram como controle. Os animais foram eutanasiados 11 semanas após a cirurgia, e foram analisadas as expressões de mRNA do MMP-1, MMP-3 e TIMP-1 da cartilagem degenerada. Os níveis de mRNA da MMP-1 e MMP-3 na cartilagem dos grupos injetados com CMCTS foram significativamente menores do que aquele grupo tratado com HA e grupo controle. Não existiu diferença significativa na expressão de MMP-1 e MMP-3 entre os grupos injetados com CMCTS. Nenhuma diferença significativa na expressão de MMP-1 e MMP-3 na cartilagem foi encontrada entre o grupo que recebeu HA e o grupo controle. Nenhuma diferença na expressão do TIMP-1 foi observada nas cartilagens de algum grupo. CMCTS pode suprimir significativamente a expressão do mRNA do MMP-1 e MMP-3 na cartilagem durante os estágios iniciais da osteoartrite, sugerindo efeito protetor na cartilagem articular osteoartrítica.

Frenkel et al. (2005) investigaram a capacidade de dois diferentes implantes multifásicos em iniciar e manter a reparação de defeitos osteocondrais em coelhos. Para preenchimento do defeito ósseo foi utilizado o implante de ácido polilático impregnado com hialuronan (HY). Para preenchimento do defeito da cartilagem foram utilizados dois suportes, um para cada grupo, sendo o primeiro um complexo polieletrólítico hidrogel de HY e quitosana, e o segundo consistiu de um suporte de colágeno tipo I. Para este estudo os autores utilizaram dezoito coelhos, que foram submetidos à criação de defeito osteocondral no côndilo medial e receberam implantes bilateralmente com um meio (tratado), ou sofreram criação do defeito sem aplicação de implante (controle). O suporte composto de HY e quitosana induziu uma reparação significativamente melhor do que o controle. A porcentagem de cartilagem hialina produzida foi superior com os implantes de colágeno. O grau de reparação da área, a integridade estrutural da neocartilagem, e a reconstituição do osso subcondral foi notável com o suporte HY e quitosana. Ambos os locais, ou seja, osso subcondral e cartilagem, coraram positivamente para colágeno tipo II e

GAG. Para os autores, ambos os implantes são capazes de manter aparência tecidual hialina nas 24 semanas, e poderão ser utilizados para liberação de diferentes fatores de crescimento ou drogas em cada compartimento, ou até mesmo diferentes doses do mesmo fator de crescimento. São indicados também como veículos para transplante de condrócitos ou de células tronco.

Li e Zhang (2005) avaliaram *in vitro* a morfologia celular, proliferação, e funcionalidade usando células HTB-94 em suportes de quitosana-alginato e quitosana pura. No suporte quitosana-alginato a proliferação de célula foi rápida quando comparada ao suporte de quitosana puro. Após cultura celular *in vitro* durante duas semanas, as células do suporte de quitosana gradualmente assumiram uma morfologia semelhante a fibroblasto, enquanto as células do suporte de quitosana-alginato mantiveram sua morfologia esférica. Neste estudo observou-se a produção de colágeno tipo II e a produção de um marcador do fenótipo do condrócito, que aumentaram da segunda para terceira semana no suporte de quitosana-alginato e diminuíram no suporte de quitosana. Por fim, os autores sugeriram que o suporte de quitosana-alginato possibilita a proliferação celular, aumenta a expressão fenotípica de condrócitos HTB-94, e pode servir como uma alternativa para melhorar os suportes de quitosana para engenharia tecidual da cartilagem.

Shi et al. (2005) avaliaram um suporte biomimético de quitosana associado ao colágeno tipo II. A biocompatibilidade e degradabilidade foram determinadas após implante subcutâneo em coelhos. Sua capacidade de suporte para manter o crescimento de condrócitos e a biossíntese foi avaliada através de suportes de células cultivadas *in vitro*. O composto quitosana / colágeno tipo II apresentou-se poroso e semelhante à esponja com poros interconectados medindo de 100 a 250 microns em diâmetro. Após ligação, o suporte apresentou aumento da força tênsil. O implante subcutâneo demonstrou biocompatibilidade e biodegradabilidade. Como suporte para células, demonstrou capacidade de sustentar a proliferação de condrócitos e sua diferenciação, mantendo o fenótipo do condrócito esférico. Através da imunoistoquímica verificou-se que os condrócitos sintetizaram colágeno tipo II.

Como a formação do coágulo em defeitos da cartilagem articular é um evento inicial importante para reparação, Hoemann et al. (2005) utilizaram um modelo experimental em ovinos utilizando a técnica de microfraturas, que consiste

na perfuração do osso subcondral visando o sangramento e formação de coágulo no local perfurado. O composto utilizado foi a base de quitosana e fosfato de glicerol associado ao coágulo de sangue (QFGsg). Avaliou-se através de exame histológico, histomorfométrico e bioquímico a capacidade de adesão do coágulo de sangue horas após a realização das microfraturas, e a qualidade da reparação da cartilagem aos seis meses do pós-operatório. Os compostos de QFGsg apresentaram, após uma hora do pós-operatório, aumento da adesão às paredes dos defeitos quando comparados apenas aos coágulos de sangue. Após o processamento histológico, todos os coágulos de sangue nos defeitos da microfratura tinham se perdido, enquanto que o composto QFGsg aderiram e estavam parcialmente retidos na superfície dos defeitos. Aos seis meses, os defeitos que tinham sido tratados com QFGsg estavam significativamente mais preenchidos com tecido de reparação hialino comparados aos defeitos controle ($p < 0,05$). O tecido de reparação dos defeitos do côndilo femoral medial que tinham sido tratados com QFGsg continham mais células e mais colágeno comparados com os defeitos controles e apresentaram completa restauração dos níveis de glicosaminoglicanos. A solidificação do implante QFGsg nos defeitos de microfraturas aumentaram a reparação da cartilagem apenas pelo aumento da quantidade de tecido e melhorando sua composição bioquímica e organização celular.

Montembault et al. (2006) desenvolveram uma formulação de um biomaterial combinando fragmentos de hidrogel de quitosana com condrócitos humanos e de coelhos. Primeiramente reportaram as propriedades das estruturas, tais como peso molecular, grau de acetilação e concentração do polímero, elaboradas com condrócitos de coelho e hidrogel de quitosana pura. Na análise morfológica foi observado que os condrócitos não penetravam no hidrogel, porém, estavam ligados à superfície dos fragmentos e formavam agregados da combinação célula/quitosana. Significante quantidade de matriz extracelular, semelhante à cartilagem neoformada, estava acumulada primeiramente entre as células e os fragmentos de hidrogel e mais tarde estavam distribuídos amplamente dentro da nova estrutura. A resposta biológica ótima foi obtida com fragmentos de hidrogel concentrado a 1,5% do polímero feito de quitosana com um grau de acetilação entre 30 e 40%. Tais hidrogéis foram, então, misturados com condrócitos humanos. O fenótipo das células foram analisados usando marcadores moleculares condrocíticos (expressão de mRNA do colágeno tipo II maturo e agrecan, tão bem como produção

de proteoglicanos de alto peso molecular) e não condrocítico (expressão de mRNA de colágeno tipo II imaturo e colágeno tipo I). Quando comparadas com condrócitos humanos cultivados sem hidrogel de quitosana no qual rapidamente se diferenciaram em cultura primária, as células misturadas com quitosana se livraram rapidamente da expressão do colágeno tipo I e do tipo II imaturo, expressando colágeno tipo II maturo e agrecan. Nestas condições, os condrócitos mantiveram seu fenótipo por 45 dias, formando, então, nódulos semelhantes à cartilagem. Estes dados sugeriram que o hidrogel de quitosana não atuou como um suporte, mas pode ser considerado um meio atrativo de componentes da matriz extracelular da cartilagem, favorecendo, então, a ligação dos condrócitos à quitosana. Tal resposta biológica pode ser descrita por um conceito de encapsulação reversa.

Kuo e Hsu (2009) realizaram experimento *in vitro* com o composto quitosana / óxido de polietileno (PEO) objetivando o desenvolvimento de um suporte para condrócitos do joelho de bovinos. Neste estudo avaliou-se a aplicação de diferentes concentrações de PEO à quitosana para verificar a melhor mistura para cultivo de condrócitos. O suporte foi submetido a testes de porosidade, tensão mecânica, estresse e deformação durante alongamento, e teste de compressão, além do comportamento térmico da formulação *a fresco*. Os condrócitos do joelho de bovinos foram cultivados para análise da citotoxicidade do composto PEO/quitosana sobre os condrócitos. A biodegradação do suporte foi estudada durante quatro semanas de cultivo. A morfologia também foi investigada. Durante quatro semanas de cultivo, verificou-se a proliferação de condrócitos, e quantificou-se a secreção de glicosaminoglicanos e colágeno por imunoistoquímica. Os autores concluíram que a porosidade, o teor de umidade, a extensibilidade mecânica, e a taxa de biodegradação do suporte PEO/quitosana aumentaram conforme a quantidade de PEO aumentava. Para a implantação direta do suporte, as percentagens com 15 a 20% de PEO podem ser apropriadas devido à força mecânica. Para aplicação clínica após cultivo *in vitro*, o conjunto com 50% de PEO foi recomendado.

Tan et al. (2009), estudaram os efeitos da variação das proporções de um liofilizado de quitosana (N-succinil-quitosana) e ácido hialurônico (Aldeído ácido hialurônico) no tempo de gelificação em temperatura ambiente, microestrutura, morfologia, inchamento, módulo de compressão e degradação *in vitro*. Os condrócitos da cartilagem articular de bovinos foram encapsulados dentro de hidrogéis *in vitro* para avaliar seu desempenho biológico e aplicabilidade como

carreador de células. A quitosana e o ácido hialurônico foram dissolvidos separadamente em PBS na concentração de 20 mg/ml e o hidrogel foi formado pela mistura das soluções na proporção de 1/9, 3/7, 5/5, 7/3 e 9/1.

O tempo de gelificação para todas as misturas ocorreu dentro de 1 a 4 minutos. A gelificação foi mais rápida quando se utilizou a proporção entre 3/7 a 7/3. A morfologia do composto foi dependente do conteúdo de polissacarídeo, ou seja, a alta concentração de quitosana resulta em poros de tamanho menores. Observou-se que a taxa de inchamento aumenta com o aumento da quitosana, exceto para o hidrogel na proporção de 1/9, devido às pobres ligações transversais. Comparando-se os dois diluentes, não se obteve diferença entre eles. Os hidrogéis 1/9 e 9/1 revelaram menos ligações transversais, aumentando a exposição das cadeias dos polímeros às moléculas de água, e levando a um aumento significativo da absorção de água e rápida perda de peso. O módulo de compressão foi estudado utilizando as misturas na proporção de 3/7, 5/5 e 7/3, e verificou-se que com aumento da percentagem de quitosana de 30% para 70%, o módulo de compressão também aumentou. A taxa de degradação dos hidrogéis apresentou influência significativa sobre a perda de peso. Na proporção 1/9 e 9/1, se dissolveram em um e nove dias, respectivamente. Nas proporções de 3/7 a 7/3 perderam seu peso acima de 28 dias. Hidrogéis com mais quitosana apresentaram perda de peso menor. Segundo os autores, há citações que atribuem ao ácido hialurônico instabilidade nas ligações transversais, entretanto, notou-se que o composto ficou estável em PBS durante quatro semanas (TAN et al., 2009).

Referente à biocompatibilidade dos condrócitos ao composto, após cultura de 24 horas, observou-se que em todas as amostras do composto os condrócitos aderiram-se menos quando comparado ao controle. O número de células na superfície foi significativamente maior para a mistura na proporção de 5/5 e 7/3. Na mistura 5/5 os condrócitos estavam na superfície e mantiveram sua morfologia poligonal. Os condrócitos encapsulados permaneceram viáveis após as 24 horas de cultura. A eficiência da encapsulação pelos hidrogéis tem a função de preservar o fenótipo dos condrócitos. As formas elíptica e arredondada dos condrócitos estavam distribuídas uniformemente no hidrogel, caracterizando a propriedade de manter a forma como na cartilagem normal (TAN et al., 2009).

Park et al. (2009) utilizaram a quitosana associado ao Pluronic® [poli (óxido de etileno) – b - poli (óxido de polipropileno) – b – poli (óxido de etileno)], um

polímero termossensível sintético, para verificar a viabilidade de carrear e liberar células. Os autores avaliaram a taxa de inchamento, o tempo de degradação, as propriedades mecânicas, a compatibilidade celular, a produção de matriz extracelular e a expressão de genes para reparação da cartilagem. Para análise da taxa de inchamento e tempo de degradação, utilizaram-se três concentrações do polímero, 16%, 18% e 20%. A taxa de inchamento do composto a 20% foi maior do que as outras, e a taxa de degradação foi menor comparada às outras. Para as diferentes concentrações, houve aumento da taxa de inchamento no terceiro dia e manteve-se até o décimo. Após os 10 dias, houve diminuição devido à dissociação do hidrogel decorrente da decomposição das ligações ésteres, chegando aos 30 dias com baixa taxa de inchamento. Portanto, a baixa taxa de degradação do composto a 20% é devido à alta densidade de ligações transversais no hidrogel.

Referente à morfologia, observou-se que o interior dos poros dos hidrogéis apresentava-se interconectado, com formas irregulares e tamanhos de poros que variaram de 10 a 100 μm . O tamanho dos poros diminuiu ligeiramente com aumento na concentração do composto e foi devido ao aumento no número de partes hidrofóbicas nos hidrogéis. Neste trabalho, o tamanho dos poros foi considerado adequado para cultura de condrócitos, tendo em vista que o tamanho maior é essencial para sua migração e proliferação (PARK et al., 2009).

Referente às propriedades mecânicas, o composto a 16% transformou-se da fase líquida para gel quando a temperatura atingiu 25° C. Houve estabilização quando a temperatura atingiu 30° C, indicando que a trama estrutural dos hidrogéis foram completadas através de uma interação hidrofóbica do grupo PPO e da cadeia da quitosana desidratada. Já o composto a 20% transformou-se da fase líquida para gel na temperatura de 15° C. O hidrogel de quitosana – Pluronic foi termossensível e segundo os autores, apresentou força mecânica para reter a estrutura e a forma no local da injeção. O tempo de transição da solução para gel foi suficiente para injetar a solução no local alvo acima de 25° C (PARK et al., 2009).

A viabilidade e proliferação dos condrócitos foram avaliadas por semeadura em hidrogel de alginato para comparar ao hidrogel de quitosana – Pluronic. Muitos dos condrócitos permaneceram viáveis em ambos os compostos imediatamente a encapsulação e por um período de 28 dias cultivados in vitro. A quantidade de células no composto quitosana – Pluronic comparado ao hidrogel de alginato aumentou discretamente no terceiro dia e notavelmente do dia 14 ao 28

(PARK et al., 2009).

Comparando-se a outros trabalhos, Park et al. (2009) concluíram que o hidrogel de quitosana / Pluronic apresentou propriedades mecânicas melhores do que do Pluronic e outros hidrogéis, indicando que a introdução da fração quitosana aumentou a força mecânica e estabilidade do hidrogel devido a este hidrogel ser formado através da interação hidrofóbica entre os grupos PPO no Pluronic e a ponte de hidrogênio entre as cadeias de quitosana. Hidrogéis com alta densidade de ligações transversais apresentam menores propriedades de inchamento. Entretanto, nestes hidrogéis, a concentração de 20% que tem maior densidade de ligações transversais apresentou maior nível de absorção de água, sugerindo que a concentração das partes hidrofóbicas (PPO) e hidrofílicas (PEO e quitosana) no hidrogel aumentaram simultaneamente.

Referente ao conteúdo de GAG, o grande crescimento celular no composto quitosana – Pluronic resultou em alta produção de GAG, de maneira significativa após o dia 14 até o 28. Quanto à expressão do gene para moléculas da matriz extracelular, avaliou-se a expressão do colágeno tipo II e do agrecan em ambos os hidrogéis. Houve maior expressão do gene do agrecan para o composto quitosana – Pluronic. A expressão do colágeno tipo II foi semelhante para ambos os hidrogéis (PARK et al., 2009).

Em 2009, Simard et al. estudaram a influência de diferentes graus de desacetilação da quitosana sobre o comportamento das células polimorfonucleadas. Segundo os autores, o grau de desacetilação da quitosana influencia nas suas propriedades físicas. Quando o grau de desacetilação aumenta, o grau de solubilidade da quitosana em diferentes solventes diminui e a suscetibilidade à biodegradação lisossomal também é diminuída. A quitosana utilizada em modelos de reparação da cartilagem é de média viscosidade e é 80% desacetilada. In vivo, a quitosana desacetilada de 50% a 80% é vagarosamente degradada e eventualmente solvida por mecanismos enzimáticos e celulares. Na reparação de microfraturas, a presença de quitosana 80% está associada com recrutamento dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) para o tecido de granulação. Em contraste, poucos PMNs migram até os orifícios criados em pequenos defeitos experimentais na ausência da quitosana. Notavelmente, os PMNs persistem na reparação dos defeitos por várias semanas, em paralelo com a degradação das partículas de quitosana 80 %.

Neste trabalho, Simard et al. (2009) estudaram os efeitos da quitosana 80% na função dos PMNs, e numa segunda etapa compararam a resposta dos PMNs a duas preparações de quitosana desacetilada a 80% e 95%. Observou-se que a maioria dos efeitos quimiotáticos da quitosana desacetilada a 80% foi mediado por lipídeos bioativos derivados da phospholipase A2, não ativando a degranulação e a produção de superóxido. A quitosana 80 M foi quimiotática para neutrófilos, entretanto, a quitosana 95 M não apresentou a mesma quimiotaxia. Por fim, o grau de acetilação da quitosana interferiu na atividade quimiotática para PMNs.

Devido aos mecanismos de solidificação do implante no local do defeito ser pouco compreendido, Marchand et al. (2009) estudaram os mecanismos de solidificação do implante quitosana – fosfato de glicerol / sangue, tendo em vista a necessidade de se obter um implante de fácil uso clínico, de rápida e controlada solidificação in situ. A mistura quitosana – fosfato de glicerol / sangue solidificou através do processo de coagulação envolvendo a produção de trombina, a polimerização da fibrina e ativação de plaquetas e alcançou força tensil do coágulo similar ao coágulo de sangue. Uma vez solidificados o coágulo híbrido manteve força tensil parcial na presença de tecido recombinante ativador de plasminogênio (tPA). Coágulos híbridos demonstraram vantagens práticas sobre os coágulos sanguíneos normais, assim como a quitosana estabilizou fisicamente o coágulo da lise e em adição estabilizou o fator plaquetário 4 e a trombina-antitrombina (TAT) contra a rápida degradação no soro após coagular. Fatores coagulantes da cascata da coagulação extrínica e trombina podem ser usados para acelerar, in situ, a solidificação dos implantes injetáveis quitosana – fosfato de glicerol / sangue em lesões da cartilagem articular in vivo. Os fatores coagulantes têm potencial para melhorar o uso prático e a atividade terapêutica dos implantes de polímero - glicerol – sangue.

3 JUSTIFICATIVA

As alterações articulares decorrentes de lesões do desenvolvimento, atividade física ou do envelhecimento nos animais e nos humanos causam dor, debilidade e um longo tempo de repouso para recuperação. Em alguns casos, o processo degenerativo torna-se irreversível, sendo possível apenas evitar sua progressão com o uso prolongado de medicamentos específicos. Em outros casos, indica-se o tratamento cirúrgico da articulação, retirando-se tecidos danificados e debridando cartilagens e cistos ósseos subcondrais, ou ainda, substituindo tecidos e colocando-se implantes.

Outras formas de tratamento têm surgido, visando à aceleração da reposição da cartilagem o mais próximo da sua normalidade. Implantes naturais e sintéticos podem ser utilizados para este fim, associado a fatores de crescimento, substâncias anabólicas, e à própria célula da cartilagem. Na maioria dos trabalhos realizados com articulação, os animais utilizados como modelo experimental são os camundongos, ratos, coelhos, ovinos e suínos, por serem de fácil manipulação, necessitarem de um espaço pequeno e pouca alimentação, além de um ciclo de vida mais curto, o qual favorece a aceleração do processo de cicatrização do tecido. Por outro lado, outros modelos de animais, tal como o equino, apresentam algumas vantagens que se assemelham às características do homem, como elevada sobrecarga, articulações amplas e lesões decorrentes do esporte. Adicionalmente, o presente estudo permitirá a validação ou não de aplicabilidade do referido implante a essa espécie.

Observamos vários estudos que tratam do uso da quitosana como suporte para células e para liberação controlada de substâncias em diferentes modelos experimentais, e ressaltamos a importância do estudo da quitosana na reparação da cartilagem articular de equinos, primeiramente para conhecermos a biocompatibilidade da substância no ambiente articular, abrindo, posteriormente, uma ampla área para desenvolvimento de pesquisas e aplicação dos resultados nesta espécie, passando para a associação de substâncias a esse material.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do talus de eqüinos

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações articulares ao exame físico.
- Avaliar as características físico-químicas e a celularidade do líquido sinovial.
- Quantificar o condroitim sulfato e o ácido hialurônico no líquido sinovial.
- Avaliar a morfologia da cartilagem antes e após implante.
- Avaliar as articulações tibiotársicas por meio do exame radiográfico, ultrassonográfico e artroscópico, buscando possíveis diferenças no processo de reparação.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, protocolado sob número 1245/2007.

5.1 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados cinco animais da espécie eqüina, com 3 anos de idade, peso médio de 307 kg (mínimo 300 kg, máximo 315 kg), machos intactos, clinicamente sadios, da raça Mangalarga.

Todos foram submetidos a vermifugação com ivermectina 1% e casqueamento antes do início do experimento. Como exames complementares para verificação da higidez e inclusão no experimento, foram realizados hemograma e provas de função renal e hepática, além do exame físico, radiográfico e ultrassonográfico.

Os animais permaneceram alojados em baias de 12 m² (3x4), no Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Receberam alimentação à base de feno de *coast cross*, água (*ad libitum*) e ração comercial para manutenção, própria para a espécie, na proporção correspondente a 1% do peso vivo do animal.

5.2 EXAME FÍSICO

Foram escolhidos os animais que não apresentaram histórico de lesões na articulação tibiotársica, que não demonstraram claudicação ao passo e ao trote, e que não responderam positivamente ao teste de flexão dos membros pélvicos.

Como sugerido por Stashak (2002), este teste foi realizado de maneira que o membro posterior permanecesse flexionado e o metatarso ficasse paralelo à superfície do solo e mantido nesta posição por 60 segundos, observando-se a locomoção do animal ao trote, antes e imediatamente após a flexão.

No período pós-operatório foi seguida conduta idêntica, porém, com a finalidade de avaliar uma possível claudicação decorrente do procedimento cirúrgico. Caso o animal apresentasse claudicação evidente ao passo, não eram submetidos ao trote ou teste de flexão, visto que são exames que impõem maior esforço e, portanto, desnecessários. Adicionalmente foi realizada a mensuração da circunferência articular para quantificar aumento de volume articular e/ou periarticular. A avaliação física ocorreu nos seguintes momentos: 0 (controle), diariamente até o dia 14, e posteriormente nos dias 21, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do pós-operatório. Os resultados obtidos durante a avaliação foram descritos em planilha padronizada. A claudicação foi graduada de 1 a 5, como segue (STASHAK, 2002):

- ☞ Grau 0: claudicação não perceptível sob quaisquer circunstâncias.
- ☞ Grau 1: claudicação difícil de se observar; sem consistência, aparentemente indiferente a circunstâncias especiais (piso duro, círculo, rampas).
- ☞ Grau 2: claudicação dificilmente observada ao passo ou trote em linha reta, condicionada a circunstâncias especiais (piso duro, círculo, rampas).
- ☞ Grau 3: claudicação observada ao trote sob quaisquer circunstâncias.
- ☞ Grau 4: claudicação observada ao passo.
- ☞ Grau 5: impotência funcional do membro.

5.3 EXAME RADIOGRÁFICO

As imagens radiográficas da articulação tibiotársica foram obtidas primeiramente durante a fase de seleção dos animais, e uma vez comprovada a integridade da mesma, foram utilizadas como imagem controle para as radiografias obtidas durante o período pós-operatório.

Durante exame radiográfico o animal permaneceu em posição quadrupedal obtendo-se imagens de ambos os membros (controle e tratado) nas projeções lateromedial e dorsoplantar, assim como as oblíquas dorsolateral-plantaromedial e dorsomedial-plantarolateral. Os exames radiográficos foram realizados nos seguintes momentos: 0 (controle), 1 (controle pós-operatório imediato), 7, 14, 21, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do pós-operatório. Para realização dos exames foi utilizado o aparelho RX Poskom PXP 20 HF.

As radiografias foram analisadas para verificação de osteoartrite segundo Kirker-Head et al. (2000), que recomenda 10 critérios para avaliação e cinco escores para cada critério, sendo que neste trabalho utilizou-se nove critérios, desconsiderando o que avalia presença ou acúmulo de gordura, conforme segue abaixo:

Critério 1 - Aumento de volume dos tecidos moles peri-articulares: 0 = Nenhum; 1 = Perda dos planos teciduais; 2 = Pequeno aumento de volume ou confinado à cápsula articular; 3 = Moderada distensão capsular; 4 = Severa distensão capsular, com envolvimento dos outros tecidos; 5 = Grande aumento de volume envolvendo todos os tecidos peri-articulares.

Critério 2 - Mineralização de tecidos moles: 0 = nenhum; 1 = suspeito; 2 = Pequeno aumento de volume ou confinado à cápsula articular; 3 = Alteração capsular ou periarticular; 4 = Reação marginal com osteófitos e entesiófitos; 5 = Grande envolvimento de tecidos peri-articulares.

Critério 3 - Aumento do espaço articular: 0 = normal; 1 = Suspeito; 2 = Imediatamente reconhecido, sem distensão da cápsula articular; 3 = Óbvio, com distensão da cápsula articular; 4 = Articulação amplamente separada; 5 = Acompanhada por subluxação ou ruptura de ligamento.

Critério 4 - Diminuição do espaço articular: 0 = Normal; 1 = Leve ou orientação desigual do espaço articular; 2 = Estreitamento, com o espaço ainda observado entre as duas extremidades ósseas; 3 = Extremidades ósseas se tocando em alguns lugares; 4 = Acompanhada por esclerose subcondral; 5 = Anquilose ou pontes trabeculares.

Critério 5 - Evidência de osteófitos: 0 = Nenhum; 1 = Sugestivo de mineralização da margem articular; 2 = Margens articulares moderadamente elevadas; 3 = Borda da margem articular facilmente reconhecida; 4 = "Labeamento" proeminente ao redor da margem articular; 5 = "Labeamento" proeminente e irregular com fragmentação ou mineralização nos tecidos moles adjacentes.

Critério 6 - Evidência de entesófitos: 0 = Nenhum; 1 = Fraco sombreamento na inserção capsular ou ligamentar; 2 = Linhas ou pontes de mineralização na inserção capsular ou ligamentar; 3 = Projeção óssea facilmente reconhecida no local da inserção;

4 = Reação óssea periosteal proeminente no local da inserção; 5 = Reação periosteal proeminente com extensiva mineralização dos tecidos moles.

Critério 7 - Esclerose do osso subcondral: 0 = Nenhuma; 1 = Suspeita ou placa óssea subcondral mais densa; 2 = Zonas escleróticas localizadas; 3 = Reação esclerótica confinada, envolvendo grande parte da placa óssea subcondral; 4 = Esclerose se estendendo de forma desigual pela epífise; 5 = Extensiva esclerose envolvendo toda placa óssea subcondral e estendendo-se através da epífise.

Critério 8 - Mudanças erosivas e lesões articulares: 0 = Nenhuma; 1 = Pequena depressão na margem subcondral, levemente irregular; 2 = Erosão superficial do osso subcondral sem esclerose; 3 = Erosão superficial do osso subcondral com zonas restritas de esclerose; 4 = Erosão irregular proeminente ou lise cística do osso subcondral e epífise, com ou sem esclerose; 5 = Severa erosão ou lesão cística estendendo-se pela epífise, com esclerose e periostite reativa.

Critério 9 - Evidência de fragmentos osteocondrais: 0 = Nenhum; 1 = Fragmento osteocondral sutil, não deslocado; 2 = Fragmento osteocondral pequeno e bem definido, separado ou não; 3 = Grande fragmento (> 10% da largura do espaço articular); 4 = Fragmento osteocondral acompanhado de moderada resposta proliferativa; 5 = Múltiplos fragmentos osteocondrais ou fragmentação com avançada resposta proliferativa.

As imagens radiográficas na projeção dorsomedial-plantarolateral foram escaneadas para avaliação do defeito osteocondral e utilizou-se o programa Image J para avaliar cinco critérios, como segue: área do defeito (cm²), bordas (bem definidas ou pouco definidas, regular ou irregular), linha de esclerose (presente ou ausente), preenchimento (homogêneo ou heterogêneo, radioluscente ou radiotransparente).

5.4 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO

O exame ultrassonográfico, a exemplo do radiográfico, foi realizado durante a fase de seleção dos animais para constatação da integridade das estruturas, sendo que durante os exames foram selecionadas imagens para impressão, servindo como controle para os demais realizados no pós-operatório. Os exames foram realizados nos seguintes momentos: 0 (controle), 1 (controle pós-operatório imediato), 7, 14, 21, 60, 120, e 180 dias do pós-operatório. Foram realizadas as seguintes mensurações: área total e área (cm²) do conteúdo anecóico

do recesso medial da articulação tibiotársica (Figura 1), e área (cm²) do defeito osteocondral em secção transversal e longitudinal.

Os achados ultrassonográficos foram descritos de acordo com a frequência de ocorrência. O recesso medial foi avaliado quanto ao conteúdo (anecóico, hipoecóico, e hiperecóico), e à característica do conteúdo (presença de pontos hiperreflexivos e de substância amorfa). Para o defeito osteocondral foi avaliado o preenchimento (homogêneo ou heterogêneo) e o conteúdo (anecóico, hipoecóico, e hiperecóico).

O equipamento utilizado foi o ultrassom ALOKA 900 com transdutor linear de 7 MHz.

Durante exame ultrassonográfico, o animal permaneceu em posição quadrupedal em tronco de contenção próprio para equinos.

Figura 1 – Imagem ultrassonográfica do local de aferição da área do recesso medial (traçado contínuo) e da área com conteúdo anecóico (traçado pontilhado).

5.5 PROCEDIMENTO ARTROSCÓPICO

Ambas as articulações tibiotársicas foram abordadas por artroscopia para inspeção prévia e realização do defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do osso *talus*. Um dos membros foi escolhido aleatoriamente para receber, no defeito criado, o implante de quitosana - fosfato de glicerol (QFG), enquanto o contra-lateral serviu como controle, conforme quadro 1.

Cavalo	Articulação Tratada	Articulação Controle	Volume
1	MPE	MPD	0,6
2	MPD	MPE	0,5
3	MPE	MPD	0,6
4	MPD	MPE	0,5
5	MPE	MPD	0,5

Quadro 1 – Identificação das articulações tratada e controle, e volume utilizado do gel de QFG, em cinco cavalos, após realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros – São Paulo - 2009.

Os equipamentos e instrumentais artroscópicos utilizados seguem abaixo:

- ☞ Artroscópio com 4 mm de diâmetro, 18 cm de comprimento e lente com 30º, modelo 11, marca Karl Storz.
- ☞ Camisa artroscópica com válvula, marca Karl Storz.
- ☞ Videocâmera modelo telecan DX NTSC, marca Karl Storz.
- ☞ Fonte de luz modelo Xênon Nova, marca Karl Storz.
- ☞ Cabo de luz, com 200 centímetros de comprimento, marca Karl Storz.
- ☞ Insuflador de CO₂, com gás pré-aquecido, marca WISAP.
- ☞ Lâmina motorizada (“shaver”) marca DMC.
- ☞ Lâminas descartáveis (marca DMC - modelo abrasiva).
- ☞ Monitor trinitron 14 polegadas modelo PVM 14N2E, marca Sony.
- ☞ Videoimpressora térmica modelo UP 2300, marca Sony.
- ☞ Filmadora digital DCR-TRV 330, marca Sony.
- ☞ Compressor de ar – Modelo Ar – Max, NS Aparelhos Médicos LTDA.

5.5.1 Preparo do animal e técnica anestésica

O animal permaneceu em jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 6 horas. Uma ampla área em ambas as articulações tíbio-társicas foi preparada de maneira rotineira para artroscopia. Antecedendo o procedimento anestésico foi administrado amicacina na dose de 15 mg/Kg e fenilbutazona na dose de 4,4 mg/Kg, ambas por via intravenosa. A sedação foi com cloridrato de xilazina 10% (0,8 mg/kg), administrada pela via intravenosa 15 minutos antes da indução anestésica. Para a indução da anestesia foi utilizado diazepam (0,05mg/kg) associado à quetamina 10% (2,0 mg/kg), e seguido de éter-gliceril-guaiacol (EGG) 10% (100 mg/kg), ambos pela via intravenosa, possibilitando assim a intubação orotraqueal. Para manutenção anestésica foi utilizado o isofluorano vaporizado em oxigênio 100%.

5.5.2 Técnica cirúrgica

O animal foi posicionado em decúbito dorsal. Os membros foram estendidos de modo que as articulações tibiotársicas direita e esquerda ficassem mantidas em angulação de aproximadamente 110°. As articulações foram submetidas a antissepsia e colocação de campos operatórios. Sobre a bolsa dorsomedial foi inserida uma agulha 40x10, permitindo a colheita de líquido sinovial e infusão de solução de ringer lactato para distensão articular. Foram criados dois acessos. O primeiro foi feito com auxílio de bisturi (lâmina nº 11), incisando a pele, tecido subcutâneo e cápsula articular sobre a bolsa dorsolateral para introdução da camisa artroscópica e artroscópio. Na camisa artroscópica foi acoplado um equipo para entrada da solução de ringer lactato, e ao artroscópio foi acoplada uma videocâmera. O segundo acesso foi feito na bolsa dorsomedial para permitir introdução dos instrumentos à superfície dorsomedial da crista troclear lateral do *talus*. Por este portal, foi introduzido uma pinça de biópsia para colheita de amostras da cartilagem articular da superfície dorsomedial da crista troclear lateral do *talus*.

(Figura 2), que foram destinados ao exame histológico. Logo após, com auxílio de um *shaver* e lâmina abrasiva foi criado um defeito osteocondral circular de 1,0 cm de diâmetro e 0,5 cm de profundidade (Figura 3). Na articulação que recebeu o implante de QFG, a distensão com ringer lactato foi substituída por gás dióxido de carbono, mantendo-se pressão de 25 mmHg, para facilitar o posicionamento e preenchimento do defeito osteocondral com o implante de QFG. No momento da cirurgia, o gel de QFG foi introduzido em uma seringa de 1,0 mililitro e por meio do portal de instrumentos a ponta da seringa foi posicionada diretamente no defeito para aplicação. Uma vez aplicado, o gel foi acomodado no defeito de forma que o preenchesse por completo (Figura 4). Na articulação contra-lateral (controle) foi realizado o mesmo procedimento, com exceção da colocação do implante. Ao término, o gás foi drenado e a pele suturada com fio de náilon nº 0, encastado de fábrica, em modelo de sutura tipo Sultan.

O pós-operatório constou de antibioticoprofilaxia sistêmica com amicacina na dose de 15 mg/Kg, por via intravenosa, a cada 24 horas, totalizando três aplicações. Como agente anti-inflamatório foi utilizada a fenilbutazona (4,4 mg/kg), via intravenosa, uma vez ao dia, durante 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, que aconteceu no 10º dia do pós-operatório. O mesmo protocolo anestésico e cirúrgico foi utilizado após 180 dias, para realização da biópsia cartilagínea.

Durante exame artroscópico as imagens foram capturadas e impressas para descrição seguindo os critérios especificados no quadro 2.

Os animais foram mantidos em baias durante todo o período experimental.

Figura 2 – Imagem artroscópica demonstrando a colheita de cartilagem para biópsia (cavalo 5).

Figura 3 – Imagem artroscópica durante a realização do defeito osteocondral com auxílio de *shaver*, na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (Cavalo 1).

Figura 4 – Imagem artroscópica do defeito osteocondral preenchido com o gel de quitosana - fosfato de glicerol. (Cavalo 1)

Critérios	Qualificação
Percentagem da área de preenchimento do defeito	0 – 100%
Textura da superfície do tecido de reparação	Compacta (L) Vilosa (V)
Preenchimento do tecido de reparação em relação à borda da cartilagem normal	Em nível (N) Abaixo (AB) Acima (AC)
Coloração do tecido de reparação	Branco (B) Branco com ponto escuro no centro (BE)
Tamanho das vilosidades da membrana sinovial do recesso medial	Normal (N) Hipertrofiada (H)
Coloração das vilosidades da membrana sinovial do recesso medial	Branca (B) Amarelada (AM) Avermelhada (Av)
Característica do tecido durante biópsia	Normal (N) Elástico (EL) Esponjoso (ES)

Quadro 2 – Critérios utilizados para descrição dos achados artroscópicos da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, após 180 dias da realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) – São Paulo - 2009.

5.6 PREPARO DO GEL À BASE DE QUITOSANA E FOSFATO DE GLICEROL

O gel foi obtido de acordo com o procedimento proposto por Chenite et al. (2000). Para tanto, 200 mg de quitosana (com alto peso molecular e grau de desacetilação superior a 75%, adquirida da empresa Sigma-Aldrich, CAS Number: 9012-76-4) foram dissolvidos em 9 ml de solução de ácido clorídrico 0,1 M. À solução resultante, foram adicionados, lentamente e sob agitação, 560 mg de fosfato de glicerol dissódico (Glycerol phosphate disodium salt hydrate – adquirida da empresa Sigma-Aldrich, CAS Number: 55073-41-1), previamente dissolvidos em 1 ml de água destilada, o que levou à formação de um gel esbranquiçado.

Após o preparo, o gel foi colocado em tubos de vidro e submetido à esterilização em autoclave, para posterior aplicação (Figura 5).

Figura 5 – Imagem fotográfica demonstrando o gel de quitosana associado ao fosfato de glicerol momentos antes da implantação no defeito osteocondral.

5.7 COLHEITA DE SANGUE

Foram colhidas amostras de sangue por venóclise jugular e acondicionadas em tubos à vácuo contendo EDTA sódico, para as dosagens de proteína total e fibrinogênio plasmáticos.

5.7.1 Análise do Fibrinogênio Plasmático

Foram realizadas quantificações de fibrinogênio nos dias 0, 2, 7 e 14, e a cada 7 dias, até a normalização. O fibrinogênio plasmático foi avaliado segundo a técnica descrita por Foster et al. (1959) e adaptada por Jain (1986), a qual se baseia na desnaturação dessa proteína a 56° C, com leitura em refratômetro.

5.7.2 Análise da Proteína Plasmática

Os níveis de proteína total foram determinados pelo método do biureto com a utilização do analisador bioquímico automático, após centrifugação da amostra.

5.8 EXAME DO LÍQUIDO SINOVIAL

As amostras do líquido sinovial foram colhidas previamente à cirurgia e nos dias 7, 14, 21, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 do pós-operatório, visando análise comparativa entre a articulação tratada e controle.

O local de punção na articulação tibiotarsica foi tricotomizado e realizada antisepsia rigorosa com o uso de iodopovidona e álcool 70%. As amostras do

líquido sinovial foram colhidas com agulha 30 x 08 e as alíquotas divididas em três frações para realização das análises.

5.8.1 Análise física do líquido sinovial

O líquido sinovial foi analisado quanto à coloração, sendo classificado como amarelo claro, 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 viscosidade foi analisada colocando-se uma gota de líquido sinovial no polegar e tocando-a com o indicador, e, após isso, separando-se os dedos para verificação da extensão do fio formado antes de se romper. A viscosidade foi graduada em boa (0 – fio com tamanho de 2,5 a 5 cm); regular (1- fio com tamanho menor que 2,5 cm); e ruim (2 - sem formação de fio).

5.8.2 Contagem global e diferencial das células do líquido sinovial

Para a contagem total de células nucleadas, 1,0 ml de líquido sinovial foi acondicionado em tubos à vácuo estéreis contendo EDTA. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 1200 rpm e o sedimento ressuspendido em 1,0 mL de solução fisiológica, realizando a contagem em câmara de Neubauer. Em seguida foram confeccionados os esfregaços e corados pelo método de Rosenfeld para a contagem diferencial dos leucócitos.

5.8.3 Dosagem da proteína total do líquido sinovial

Para as dosagens de proteína total foi utilizado o sobrenadante retirado após centrifugação da amostra destinada à contagem global de células nucleadas. As dosagens da proteína total foram realizadas pelo método do biureto com a utilização do analisador bioquímico automático.

5.8.4 Quantificação do Condroitim Sulfato e Ácido Hialurônico (Extração dos GAGs do líquido sinovial)

Para extração dos GAGs do líquido sinovial, 100 µl de cada amostra foram incubados com 200 µl de maxatase (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.

5.8.4.1 Identificação dos GAGs do líquido sinovial (Condroitim Sulfato e Ácido Hialurônico).

Alíquotas (5 µl) das soluções de GAGs do líquido sinovial foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,055%) com tampão 1,3 - diaminopropano-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 condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato. Queratam sulfato tem migração semelhante à do condroitim sulfato ou do dermatam sulfato, dependendo do seu grau de sulfatação. O heparam sulfato migra como heparina.

No líquido sinovial, o tampão PDA discrimina por ordem decrescente de mobilidade eletroforética, o condroitim sulfato e o ácido hialurônico que forma um arraste não metacromático (azul).

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

A quantificação dos GAGs foi realizada por densitometria dos géis secos e corados.

5.9 ANÁLISE DA CARTILAGEM ARTICULAR

Amostras da cartilagem articular foram colhidas antes e após o implante da QFG, aos 180 dias. Logo após a colheita da cartilagem as amostras foram divididas em dois fragmentos. Um fragmento foi destinado à análise dos proteoglicanos. O outro fragmento foi destinado à análise morfológica e foi fixado em metacarn durante 6 horas, e após, mantido em álcool 90° GL.

5.9.1 Análise de proteoglicanos

5.9.1.1 Marcação metabólica dos proteoglicanos de cartilagem articular com ³⁵S-Sulfato.

Fragmentos de cartilagem articular, obtidos por artroscopia, foram colocados em 10 ml de meio F12 contendo penicilina (10.000 U) e estreptomicina (100 mg) e ainda, ³⁵S - Sulfato (100 µCi) para marcação metabólica de proteoglicanos. Estes tecidos foram mantidos em condições de cultura de tecido por 24 horas a 37°C, em incubadora com atmosfera de CO₂ 5%. Após este período, o meio e o fragmento de tecido foram coletados e as macromoléculas do meio de

cultura foram precipitadas pela adição lenta e sob agitação de três volumes de metanol. Após 18 horas a -20°C , o precipitado formado foi coletado por centrifugação (3000 X g, 20 minutos), seco a vácuo e ressuspenso em 100 μl de água destilada para posterior análise. Dos tecidos, foram extraídos proteoglicanos, como descrito a seguir.

5.9.1.2 Extração de proteoglicanos da cartilagem articular

Para extração dos ^{35}S -proteoglicanos, o fragmento de cartilagem articular foi incubado com 1 ml de hidrocloreto de guanidina 4 M (GuHCl) em tampão acetado de sódio 0,15 M, pH 6,5, contendo inibidores de proteases: ácido ε -aminocapróico 0,1 M, benzamina 6,5 mM, iodoacetamida 5,5 mM e PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) 0,1 mM. Após 18 horas de incubação sob agitação a 4°C , o sobrenadante foi reservado e foram adicionados mais 0,5 ml da mesma solução, repetindo-se o procedimento. Os fragmentos ainda presentes foram separados por centrifugação e os sobrenadantes (1,5 ml) de ambas extrações foram combinados e as macromoléculas foram precipitadas pela adição lenta de três volumes de metanol, sob agitação. O precipitado formado após 18 horas a -20°C foi coletado por centrifugação (3000 X g, 20 minutos), lavado com metanol, seco a vácuo e ressuspenso em 100 μl de água destilada. O sobrenadante foi desprezado.

5.9.1.3 Identificação e quantificação de proteoglicanos

5.9.1.3.1 Eletroforese em gel de agarose

Para identificação e/ou quantificação dos proteoglicanos, 5 μl do material foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,55% em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05M, pH 9,0 (PDA) desenvolvido por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976). Uma mistura padrão de

glicosaminoglicanos (5 µl), contendo condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, na concentração de 1mg/ml cada, foi aplicada às lâminas como controle. A corrida eletroforética foi realizada em cuba refrigerada, submetida a uma diferença de potencial de 100V, durante aproximadamente 1 hora. Ao término da corrida eletroforética, os proteoglicanos foram precipitados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1%, por um período mínimo de 2 horas. O gel foi então seco sob calor e ventilação e corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1%: etanol 50%. O excesso de corante foi retirado por lavagem na mesma solução (ácido acético 1%:etanol 50%). Os proteoglicanos foram quantificados por densitometria.

5.9.1.3.2 *Proteoglicanos marcados com ^{35}S - Sulfato*

As bandas do gel de eletroforese em agarose contendo radioatividade foram detectadas, por radioautograma (raio x ou tela sensível a leitura em Ciclone Packard). As bandas foram raspadas do gel, retiradas, mergulhadas em líquido de cintilação (Ultima Gold TM), e a radioatividade foi quantificada em um contador de cintilações (Tri-Carb 2100TR Packard). A radioatividade de cada amostra foi expressa em cpm (centilações por minuto).

5.10 ANÁLISE MORFOLÓGICA / HISTOLOGIA

Cada amostra da cartilagem colhida foi cortada e embebida em parafina. Foram realizadas secções de 3 µm de espessura e as amostras foram coradas por hematoxilina e eosina, para posterior análise.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados segundo a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov; em seguida foi utilizado modelo de análise de variância para verificar o efeito de grupos e momentos. O contraste entre médias foi feito pela d.m.s do teste de Tukey-Kramer a nível de 5% de probabilidade. Para os valores não paramétricos foram utilizados os testes Kruskal-Wallis para comparação entre os momentos no mesmo grupo, e o Mann – Whitney para comparação entre os grupos (SAMPAIO, 1998).

6 RESULTADOS

6.1 EXAME FÍSICO

6.1.1 Graduação da claudicação

Para ambos os grupos, o grau de claudicação foi maior entre o dia 1 e 60 do pós-operatório, com diminuição a partir do dia 60 até o 180º dia do pós-operatório. O aumento ocorrido no dia 7 demonstrou diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado aos dias 90, 120, 150 e 180 do pós-operatório. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Os dados obtidos da graduação da claudicação dos membros pélvicos estão demonstrados nos apêndices A e B, na tabela 1, e no gráfico 1.

Tabela 1 - Medianas da graduação da claudicação de membros pélvicos, de cinco cavalos, obtidos após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo - 2009.

DIAS	MEDIANA	
	GRUPO TRATADO	GRUPO CONTROLE
1	2 ^{abA}	2 ^{abA}
7	3 ^{bA}	2 ^{bA}
15	2 ^{abA}	2 ^{abA}
21	2 ^{abA}	2 ^{abA}
30	2 ^{abA}	2 ^{abA}
60	1 ^{abA}	1 ^{abA}
90	1 ^{aA}	1 ^{aA}
120	1 ^{aA}	1 ^{aA}
150	1 ^{aA}	1 ^{aA}
180	1 ^{aA}	1 ^{aA}

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Gráfico 1 – Representação gráfica das medianas obtidas da graduação da claudicação de membros pélvicos, de cinco cavalos, após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo - 2009

6.1.2 Mensuração da circunferência articular

Analisando os dados obtidos do membro tratado, houve aumento significativo da circunferência da articulação tibiotársica quando se comparou os dias 7 ($p < 0,001$), 14 ($p < 0,001$), 21 ($p < 0,001$), 30 ($p < 0,001$), 60 ($p < 0,001$), 90 ($p < 0,05$), 120 ($p < 0,05$), 150 ($p < 0,01$) e 180 ($p < 0,01$) do pós-operatório ao dia 0. Comparando-se os dias 90 e 120 com o dia 21, observou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) da circunferência articular. Também houve diminuição significativa da circunferência articular quando se comparou os dias 90 ($p < 0,01$), 120 ($p < 0,01$), 150 ($p < 0,05$) e 180 ($p < 0,05$) com o dia 30 do pós-operatório.

Referente ao membro controle houve aumento significativo ($p < 0,01$) da articulação quando se comparou os dias 7, 15, 21 e 30 do pós-operatório ao dia 0.

Não se observou diferença estatística significativa entre os grupos.

Os dados obtidos da mensuração da circunferência da articulação tibiotársica estão demonstrados nos apêndices C e D, na tabela 2, e no gráfico 2.

Tabela 2 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da circunferência (cm linear) da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo - 2009.

DIAS	GRUPO TRATADO		GRUPO CONTROLE	
	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP
0	29,2 ^{aA}	0,75	29,3 ^{aA}	0,67
7	33,3 ^{bcA}	1,48	32,8 ^{bA}	2,7
15	33 ^{bcA}	2,12	32,9 ^{bA}	2,01
21	33,9 ^{bA}	2,07	32,5 ^{bA}	2,44
30	34,2 ^{bA}	1,64	32,6 ^{bA}	2,3
60	32,9 ^{bcA}	1,94	31,7 ^{abA}	1,30
90	31,4 ^{cA}	1,51	31 ^{abA}	1
120	31,6 ^{cA}	1,81	31 ^{abA}	1,22
150	32 ^{cA}	0,79	31,1 ^{abA}	1,24
180	31,8 ^{cA}	1,15	31,4 ^{abA}	1,34

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 2 – Representação gráfica dos valores médios da circunferência (cm) da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo, 2010.

6.2 EXAME RADIOGRÁFICO

Dentre os nove critérios avaliados, as alterações encontradas ficaram restritas a apenas três critérios: aumento de volume dos tecidos moles peri-articulares; evidência de osteófitos; e evidência de entesófitos.

Todos cavalos demonstraram aumento de volume peri-articular para ambos os membros com escore variando de 1 a 5.

Três cavalos demonstraram presença de osteófitos com escore 1, e destes, dois apresentaram apenas no membro tratado (cavalos 1 e 3), e um apresentou em ambos os membros (cavalo 5).

Um cavalo (cavalo 1) apresentou entesófitos na articulação do membro tratado, que se manteve com escore 1.

Quanto ao escore obtido no dia 2 do pós-operatório, para ambos os grupos, não se notou alteração quando comparado ao dia 0. Observou-se aumento do escore a partir do dia 7 até o dia 180 para ambos os grupos, entretanto, o escore tendeu a diminuir mais cedo para o grupo controle.

Para o grupo tratado, houve aumento significativo da mediana do escore radiográfico quando se comparou o dia 0 aos dias 14 ($p<0,01$), 21 ($p<0,05$), e 30 ($p<0,05$) do pós-operatório. Para o grupo controle, houve aumento significativo quando se comparou o dia 0 aos dias 07 ($p<0,05$), 14 ($p<0,01$), 21 ($p<0,01$), e 30 ($p<0,05$) do pós-operatório. Não houve diferença estatística significante entre os grupos.

Os dados obtidos do escore da avaliação radiográfica estão demonstrados nos apêndices de E a N, na tabela 3 e no gráfico 3.

Tabela 3 – Medianas obtidas em diferentes momentos do escore de avaliação radiográfica da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo - 2009.

DIAS	MEDIANA	
	GRUPO TRATADO	GRUPO CONTROLE
0	0 ^{aA}	0 ^{aA}
2	0 ^{abA}	0 ^{abA}
7	3 ^{abA}	3 ^{bA}
14	3 ^{bA*}	3 ^{bA*}
21	3 ^{bA}	3 ^{bA*}
30	3 ^{bA}	2 ^{bA}
60	2 ^{abA}	2 ^{abA}
90	2 ^{abA}	1 ^{abA}
120	2 ^{abA}	1 ^{abA}
150	1 ^{abA}	1 ^{abA}
180	1 ^{abA}	1 ^{abA}

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p<0,05$ (* $p<0,01$).
Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Gráfico 3 - Representação gráfica das medianas do escore de avaliação radiográfica da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo - 2009

Referente à mensuração da área do defeito osteocondral, para o grupo tratado, houve diminuição significativa estatisticamente, quando se comparou o dia 1 aos dias 120 ($p<0,05$) e 180 ($p<0,05$), o dia 7 aos dias 120 ($p<0,05$) e 180 ($p<0,05$),

o dia 14 aos dias 60 ($p<0,05$), 90 ($p<0,05$), 120 ($p<0,01$) e 180 ($p<0,01$), e o dia 21 aos dias 120 ($p<0,05$) e 180 ($p<0,05$).

Quanto ao grupo controle, houve diminuição significativa estatisticamente, quando se comparou o dia 1 aos dias 90 ($p<0,001$), 120 ($p<0,001$), 150 ($p<0,001$) e 180 ($p<0,001$), o dia 7 aos dias 90 ($p<0,01$), 120 ($p<0,001$), 150 ($p<0,001$) e 180 ($p<0,001$), o dia 14 aos dias 90 ($p<0,001$), 120 ($p<0,001$), 150 ($p<0,001$) e 180 ($p<0,001$), o dia 21 aos dias 120 ($p<0,01$), 150 ($p<0,05$) e 180 ($p<0,01$), o dia 30 aos dias 120 ($p<0,05$) e 180 ($p<0,01$), e o dia 60 ao 180 ($p<0,05$).

Os dados obtidos da mensuração da área do defeito osteocondral através da avaliação radiográfica estão demonstrados nos apêndices Q e R, na tabela 4 e no gráfico 4.

Tabela 4 - Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) do defeito osteocondral da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame radiográfico após realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo – 2009.

DIAS	GRUPO TRATADO		GRUPO CONTROLE	
	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP
2	0,44 ^{aA}	0,07	0,58 ^{acB}	0,08
7	0,43 ^{aA}	0,15	0,53 ^{acA}	0,11
14	0,46 ^{aA}	0,09	0,55 ^{ca}	0,07
21	0,44 ^{acA}	0,14	0,46 ^{acA}	0,12
30	0,38 ^{acA}	0,11	0,44 ^{acA}	0,14
60	0,29 ^{acdA}	0,08	0,42 ^{ab}	0,05
90	0,29 ^{bcA}	0,08	0,28 ^{aA}	0,06
120	0,26 ^{bdA}	0,03	0,24 ^{bA}	0,05
150	0,32 ^{bdA}	0,03	0,26 ^{acA}	0,05
180	0,26 ^{bA}	0,08	0,22 ^{bA}	0,08

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Gráfico 4 - Representação gráfica da área (cm²) do defeito osteocondral da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame radiográfico após realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo - 2009

Referente às características do preenchimento do defeito ósseo, para o grupo controle notou-se nas avaliações no período entre o dia 1 e 30 uma tendência de estarem mais homogêneos e mais radiotransparentes.

Aos 60 dias, 60% dos defeitos se apresentavam com conteúdo homogêneo e 40% heterogêneo; 60% estavam mais radiotransparentes e 40% menos radiotransparentes.

Aos 90 dias notou-se predomínio da característica homogênea e menos radiotransparente. Aos 120 dias, 80% dos defeitos apresentaram homogeneidade do preenchimento e 20% estavam heterogêneos; 80% menos radiotransparentes e 20% mais radiotransparentes. Aos 150 e 180 dias notou-se 100% de homogeneidade e menos radiotransparência nos defeitos.

Referente às bordas do defeito para o grupo controle, notou-se do dia 1 ao 30 a tendência das bordas estarem bem definidas e regulares. Aos 60 dias, 60% estavam bem definidas e 40% pouco definidas; 60% regulares e 40% irregulares. Dos 90 aos 180 dias, notou-se 80% das bordas pouco definidas e 20% de bordas bem definidas. Para este grupo notou-se presença de esclerose em 80% dos defeitos a partir do dia 21 até o 180.

Características semelhantes do preenchimento foram observadas para o grupo tratado, porém, dos 120 aos 180 dias notou-se 80% dos defeitos com característica homogênea e 20% heterogêneo.

No grupo tratado notou-se bordas bem definidas do dia 1 ao 21 para todos os defeitos e predomínio de bordas regulares. Nos dias 30 e 60 notou-se em 60% dos defeitos bordas pouco definidas e 40% bem definidas, e tendência a serem irregulares. A partir do dia 90 ao 180, as bordas estavam pouco definidas e irregulares. Para este grupo notou-se linha de esclerose circundando todos os defeitos a partir do dia 21.

Os dados obtidos das características radiográficas do defeito osteocondral estão demonstrados na figura 6, e nos quadros de 3 a 6.

Figura 6 – Imagens radiográficas demonstrando o defeito osteocondral com diminuição de tamanho e radiotransparência no decorrer do período experimental. (A) 7 dpo; (B) 60 dpo; (C) dia 120 dpo; (D) 180 dpo.

DIAS	Definição das bordas		Contorno das bordas		Esclerose	
	BD	PD	R	IR	P	A
1	5	0	5	0	0	5
7	5	0	4	1	1	4
14	5	0	5	0	4	1
21	5	0	5	0	5	0
30	2	3	2	3	5	0
60	2	3	0	5	5	0
90	1	4	0	5	5	0
120	0	5	0	5	5	0
150	0	5	0	5	5	0
180	0	5	0	5	5	0

Definição das bordas (BD - bem definidas; PD - pouco definidas); Contorno das bordas (R - regular; IR - irregular); Esclerose (P - presente; A - ausente).

Quadro 3 – Avaliação radiográfica, na projeção dorsomedial-plantarolateral, das bordas de defeitos osteocondrais criados na tróclea lateral do talus, de cinco cavalos (grupo tratado) - São Paulo - 2009.

DIAS	Definição das bordas		Contorno das bordas		Esclerose	
	BD	PD	R	IR	P	A
1	5	0	5	0	1	4
7	5	0	5	0	2	3
14	5	0	5	0	3	2
21	4	1	5	0	4	1
30	4	1	4	1	4	1
60	3	2	3	2	4	1
90	1	4	3	2	4	1
120	1	4	2	3	4	1
150	1	4	2	3	4	1
180	1	4	2	3	4	1

Definição das bordas (BD - bem definidas; PD - pouco definidas); Contorno das bordas (R - regular; IR - irregular); Esclerose (P - presente; A - ausente)

Quadro 4 – Avaliação radiográfica, na projeção dorsomedial-plantarolateral, das bordas de defeitos osteocondrais criados na tróclea lateral do talus, de cinco cavalos (grupo controle) - São Paulo, 2010.

DIAS	Distribuição do tecido		Radiotransparência	
	Homogêneo	Heterogêneo	Mais	Menos
1	5	0	5	0
7	5	0	5	0
14	4	1	5	0
21	4	1	4	1
30	4	1	2	3
60	5	0	1	4
90	4	1	2	3
120	4	1	0	5
150	4	1	0	5
180	4	1	0	5

Quadro 5 – Avaliação radiográfica, na projeção dorsomedial-plantarolateral, da característica de preenchimento dos defeitos osteocondrais criados na tróclea lateral do talus, de cinco cavalos (grupo tratado) - São Paulo, 2010.

DIAS	Distribuição do tecido		Radiotransparência	
	Homogêneo	Heterogêneo	Mais	Menos
1	5	0	5	0
7	4	1	5	0
14	4	1	5	0
21	3	2	4	1
30	4	1	4	1
60	3	2	3	2
90	4	1	1	4
120	5	0	0	5
150	5	0	0	5
180	5	0	0	5

Quadro 6 – Avaliação radiográfica, na projeção dorsomedial-plantarolateral, da característica de preenchimento dos defeitos osteocondrais criados na tróclea lateral do talus, de cinco cavalos (grupo tratado) - São Paulo - 2009.

6.3 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO

6.3.1 Mensuração do recesso medial da articulação tibiotarsometatarsica

Para o grupo tratado e controle notou-se aumento da área total do recesso medial até os 60 dias do pós-operatório, e posterior diminuição até os 180 dias, próximo aos valores do exame pré-operatório. Esse aumento foi significativo apenas para o grupo controle, quando se comparou o dia 0 aos dias 21 ($p < 0,05$) e 60 ($p < 0,05$).

Não se observou diferença estatística significativa entre os grupos.

As mensurações da área total e da área com conteúdo anecóico do recesso medial da articulação tibiotársica encontram-se demonstradas nos apêndices de S a V, nas tabelas 5 e 6, e no gráfico 5.

Tabela 5 - Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área total (cm^2) do recesso medial da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo - 2009.

DIAS	GRUPO TRATADO		GRUPO CONTROLE	
	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP
0	2,36 ^{aA}	0,64	2,13 ^{aA}	0,59
1	2,73 ^{aA}	0,78	3,22 ^{abA}	0,86
7	3,0 ^{aA}	0,77	2,85 ^{abA}	0,51
14	3,05 ^{aA}	0,39	3,40 ^{abA}	1,03
21	3,21 ^{aA}	0,21	3,95 ^{bA}	1,09
60	3,81 ^{aA}	0,51	3,97 ^{bA}	1,09
120	3,30 ^{aA}	0,50	3,11 ^{abA}	0,49
180	2,39 ^{aA}	1,18	2,36 ^{abA}	1,15

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

As mensurações da área de conteúdo anecóico foram semelhantes para ambos os grupos. Para o grupo controle houve uma tendência de ser maior comparado ao grupo tratado.

Para o grupo tratado, houve diminuição significativa da área nos dias 21 ($p < 0,05$), 60 ($p < 0,05$) e 180 ($p < 0,05$) do pós-operatório, comparado ao dia 0. Para o

grupo controle, notou-se diminuição significativa da área no dia 60 comparado aos dias 0 ($p<0,05$), 1 ($p<0,05$), 15 ($p<0,05$) e 90 ($p<0,05$) do pós-operatório.

Não se observou diferença estatística significativa entre os grupos.

Tabela 6 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) com conteúdo anecóico do recesso medial, da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo - 2009.

DIAS	GRUPO TRATADO		GRUPO CONTROLE	
	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP
0	1,31 ^{aA}	0,31	1,28 ^{aA}	0,57
1	0,84 ^{abA}	0,66	1,30 ^{aA}	0,34
7	0,60 ^{abA}	0,49	0,92 ^{abA}	0,79
14	0,81 ^{abA}	0,81	1,35 ^{aA}	0,55
21	0,46 ^{bA}	0,32	0,81 ^{abA}	0,68
60	0,54 ^{bA}	0,26	0,61 ^{bA}	0,44
120	0,99 ^{abA}	0,59	1,40 ^{abA}	1,26
180	0,56 ^{bA}	0,20	0,69 ^{abA}	0,28

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Gráfico 5 – Representação gráfica dos valores médios da área total (AT) (cm^2) e da área com conteúdo anecóico (AA) (cm^2) do recesso medial da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo – 2009.

6.3.2 Mensuração da área do defeito osteocondral

Houve diminuição da área durante o período experimental que seguiu o mesmo padrão para o membro tratado e o controle.

Em secção longitudinal, para o membro tratado, existiu diferença significativa quando se comparou o dia 1 aos dias 120 ($p<0,01$) e 180 ($p<0,001$); o dia 7 ao 180 ($p<0,01$); 14 ao 180 ($p<0,05$); 21 ao 120 ($p<0,05$) e 180 ($p<0,001$).

Para o membro controle, observou-se diferença significativa quando se comparou o dia 1 ao 180 ($p<0,05$); 7 ao 120 ($p<0,01$) e 180 ($p<0,01$); 14 ao 120 ($p<0,05$) e 180 ($p<0,05$).

As mensurações da área do defeito osteocondral (secção longitudinal e transversal) estão demonstrados nos apêndices de W a AA, nas tabelas 7 e 8, e nos gráficos 6 e 7.

Tabela 7 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo – 2009.

DIAS	GRUPO TRATADO		GRUPO CONTROLE	
	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP
1	0,52 ^{aA}	0,15	0,46 ^{aCA}	0,30
7	0,45 ^{abA}	0,14	0,53 ^{aA}	0,25
14	0,43 ^{abA}	0,09	0,47 ^{aA}	0,10
21	0,49 ^{aA}	0,11	0,41 ^{abA}	0,11
60	0,32 ^{abA}	0,13	0,41 ^{abA}	0,10
120	0,24 ^{bA}	0,08	0,23 ^{bcA}	0,08
180	0,18 ^{bA}	0,09	0,21 ^{bA}	0,15

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Gráfico 6 – Representação gráfica dos valores médios da área (cm²) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (tratado e controle) - São Paulo - 2010.

Em secção transversal, houve diminuição da área do defeito de forma semelhante, para ambos os grupos, sem diferença estatística significativa. Aos 180 dias do pós-operatório observou-se reparação incompleta, que seguiu o mesmo padrão para ambos os grupos.

No grupo tratado, houve diminuição significativa da área quando se comparou o dia 1 ao 120 ($p < 0,05$); 7 ao 120 ($p < 0,01$); e 14 ao 120 ($p < 0,05$).

Para o membro controle observou-se diminuição significativa da área quando se comparou o dia 1 ao 120 ($p < 0,001$), e 180 ($p < 0,01$); 7 ao 120 ($p < 0,001$), e 180 ($p < 0,001$); 14 ao 120 ($p < 0,05$) e 180 ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm²) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção transversal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo - 2009.

DIAS	GRUPO TRATADO		GRUPO CONTROLE	
	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP
1	0,44 ^{aA}	0,15	0,51 ^{aA}	0,18
7	0,49 ^{aA}	0,24	0,52 ^{aA}	0,19
14	0,47 ^{aA}	0,12	0,42 ^{acA}	0,15
21	0,40 ^{abA}	0,09	0,4 ^{abA}	0,12
60	0,33 ^{abA}	0,14	0,32 ^{abA}	0,12
120	0,17 ^{bA}	0,07	0,16 ^{bA}	0,09
180	0,23 ^{abA}	0,19	0,17 ^{bA}	0,10

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 7 – Representação gráfica dos valores médios da área (cm²) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção transversal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (tratado e controle) - São Paulo - 2009

6.3.3 Descrição dos achados ultrassonográficos

Para o grupo tratado, o conteúdo anecóico e hipoecóico da bolsa medial apareceu com freqüência semelhante no decorrer do experimento, seguido do hiperecóico. Para o grupo controle, o conteúdo que predominou foi o anecóico, seguido do hiperecóico e hipoecóico.

Quanto à característica do conteúdo da bolsa medial, em ambos os grupos e com freqüência semelhante, foi observado presença de substância amorfa.

No grupo tratado foi observada uma freqüência maior de pontos hiper-reflexivos, comparado ao grupo controle.

O preenchimento do defeito osteocondral por tecido de característica heterogênea foi o predominante para o grupo tratado e controle.

Quanto ao conteúdo dos defeitos, o preenchimento se apresentou com predomínio da característica hipoecogênica.

As imagens ultrassonográficas do recesso medial e do defeito osteocondral e a descrição dos principais achados ultrassonográficos estão apresentados nas figuras 7 e 8 nos quadros 7 e 8.

Figura 7 – Imagens ultrassonográficas do recesso medial do cavalo 1 demonstrando (A) conteúdo anecóico no pré-operatório; (B) e substância amorfa em grande quantidade no exame do dia 21 dpo. A área interna do traçado pontilhado representa o fluido sinovial, e a área entre os traçados representa as vilosidades sinoviais e fibrina.

Figura 8 – Imagens ultrassonográficas do defeito osteocondral do cavalo 3, limitado pelo traçado pontilhado. (A) nota-se característica heterogênea hipoeecóica no dia 7 dpo, e (B) heterogênea hipereecóica aos 180 dias dpo.

Dias	Recesso medial					Defeito osteocondral				
	Conteúdo			Característica do conteúdo		Preenchimento		Conteúdo		
	A	H	Hp	PH	SA	Hm	Ht	A	H	Hp
0	5	0	0	0	5	-	-	-	-	-
1	2	2	1	1	5	1	4	0	5	0
7	0	2	3	1	5	1	4	1	3	1
14	1	3	1	1	5	1	4	0	5	0
21	2	1	2	2	5	3	2	2	3	0
60	2	2	1	1	5	2	3	0	5	0
120	2	2	1	0	5	1	4	0	5	0
180	2	3	0	0	4	3	2	0	2	3

Legenda: A – anecóico; H – hipoeecóico; Hp – hipereecóico; PH – pontos hiperreflexíveis; SA – substância amorfa; Hm – homogêneo; Ht – heterogêneo.

Quadro 7 – Frequência de achados obtidos durante exame ultrassonográfico da articulação tíbiotarsica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009

Dias	Recesso medial					Defeito osteocondral				
	Conteúdo		Característica do conteúdo			Preenchimento		Conteúdo		
	A	H	Hp	PH	SA	Hm	Ht	A	H	Hp
0	3	1	1	0	5	-	-	-	-	-
1	2	1	2	0	5	0	5	0	4	1
7	3	0	2	2	4	2	3	0	4	1
14	3	0	2	0	5	1	4	1	4	0
21	3	0	2	0	5	4	1	1	4	0
60	2	2	1	0	5	1	4	0	4	1
120	4	1	0	0	5	4	1	2	2	1
180	4	1	0	0	4	2	3	0	4	1

Legenda: A – anecóico; H – hipocóico; Hp – hiperecóico; PH – pontos hiperreflexíveis; SA – substância amorfa; Hm – homogêneo; Ht – heterogêneo.

Quadro 8 – Frequência de achados obtidos durante exame ultrassonográfico da articulação tíbiotarsica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

6.4 EXAME ARTROSCÓPICO

A angulação de 110º utilizada para posicionamento dos membros durante as artroscopias permitiu boa visualização das estruturas internas e manipulação do artroscópio e instrumentais, além de facilitar a extensão e flexão do membro quando necessário.

Para realização do defeito osteocondral, no membro direito do cavalo 5 houve dificuldade em posicionar a lâmina do *shaver* na face medial da crista troclear lateral, devido a interferência do tendão tibial cranial. Após alteração do posicionamento do membro foi possível a realização do procedimento.

Quanto às características do gel, notou-se que o conteúdo se moldou ao tubo de vidro utilizado para esterilização e se tornou de consistência firme, proporcionando facilidade na apreensão. Devido a esta alteração na consistência, não foi possível aspirar o gel pela seringa de 1,0 ml. Desta forma, foi necessária a colocação do gel em uma seringa de 20 ml com ponta, para posterior aplicação no tubo da seringa de 1,0 ml.

Após a aplicação, o gel foi acomodado no defeito com auxílio de uma espátula, demonstrando boa moldabilidade. Este procedimento foi facilitado com a utilização do gás dióxido de carbono, que permitiu boa visualização do ambiente intra-articular e do defeito osteocondral, além de manter a característica física do gel durante a manipulação.

A manutenção do gel após implante no defeito foi verificada em um cavalo que veio a óbito ao término do procedimento cirúrgico, decorrente de complicações anestésicas, e, portanto, foi substituído. A articulação tratada foi submetida a 100 movimentos completos de flexão e extensão, e posteriormente aberta com auxílio de bisturi. Constatou-se a manutenção do gel internamente ao defeito e com sua superfície lisa, demonstrando moldabilidade à superfície articular da tíbia após o procedimento e instituição de movimentos de flexão, o que deve ocorrer in vivo no período pós-operatório. O gel foi removido do defeito em um único bloco com auxílio de uma lâmina de bisturi.

Quanto à percentagem da área de preenchimento do defeito, em oito articulações o defeito estava preenchido por completo (5 tratada - 50%; 3 controle - 30%), e em duas estavam preenchidos parcialmente (2 controle - 20%).

Referente à textura do tecido de reparação, observou-se tecido de aspecto viloso preenchendo o defeito em cinco articulações (3 tratada - 30%; 2 controle - 20%), e em outras cinco articulações os defeitos estavam preenchidos em grande parte com tecido de textura compacta e uma pequena parte com tecido de aspecto viloso (2 tratada - 20%; 3 controle - 30%).

Referente ao volume de preenchimento com tecido de reparação em relação à borda da cartilagem normal, em sete articulações a reparação ficou abaixo da borda do tecido normal (4 tratada - 40%; 3 controle - 30%), em uma estava nivelada (1 controle - 10%), e em duas estava acima da borda da cartilagem normal (1 tratada - 10%; 1 controle - 10%).

Avaliando a coloração do tecido de reparação, em oito articulações observou-se tecido de coloração branca (4 tratada - 40%; 4 controle - 40%) e em duas articulações observou-se tecido de coloração branca com área central escura (1 tratada - 10%; 1 controle - 10%).

Durante observação do tamanho das vilosidades da membrana sinovial do recesso medial, em cinco articulações constatou-se tamanho normal (4 tratada -

40%; 1 controle – 10%), e em cinco articulações apresentaram-se hipertrofiadas (1 tratada – 10%; 4 controle – 40%).

Quanto à coloração das vilosidades da membrana sinovial do recesso medial, em seis articulações apresentaram-se brancas (4 tratada – 40%; 2 controle – 20%), em uma coloração amarelada (1 controle – 10%), em uma avermelhada (1 tratada – 10%), e em duas de coloração avermelhada e amarelada (2 controle – 20%).

Por fim, referente à característica de resistência do tecido durante a realização da biópsia, em oito articulações apresentaram-se elástica (4 tratada – 40%; 4 controle – 40%), e em duas articulações de característica esponjosa (1 tratada – 10%; 1 controle – 10%).

As imagens artroscópicas representativas do tecido de reparação e os achados da avaliação artroscópica aos 180 dias estão apresentados na figura 9 e no quadro 9.

Figura 9 – Imagens artroscópicas demonstrando preenchimento com tecido de reparação após 180 dias da criação do defeito. (A) tecido viloso (cavalo 3 controle); (B) tecido mais compacto, com poucas vilosidades (cavalo 3 tratado).

CRITÉRIO		IDENTIFICAÇÃO DO CAVALO									
		1 T	1 C	2 T	2 C	3 T	3 C	4 T	4 C	5 T	5 C
1	Percentagem da área de preenchimento do defeito	100	100	100	95	100	100	100	90	100	100
2	Textura da superfície do tecido de reparação	V100%	C90% V10%	C80% V20%	V100%	C95% V5%	C80% V20%	V100%	V100%	V100%	C80 % V20%
3	Preenchimento do tecido de reparação em relação à borda da cartilagem normal	AB	AB	AB	AB	AB	N	AB	AB	AC	AC
4	Coloração do tecido de reparação	B	BE	B	B	BE	B	B	B	B	B
5	Tamanho das vilosidades da membrana sinovial do recesso medial	N	H	N	H	H	H	N	N	N	H
6	Coloração das vilosidades da membrana sinovial do recesso medial	B	Am/Av	B	Am	Av	Am/Av	B	B	B	B
7	Característica do tecido durante biópsia	EL	EL	EL	EL	ES	ES	EL	EL	EL	EL

Legenda: T = grupo tratado; C = grupo controle. **Qualificação para cada critério:** 1 = 0 a 100%; 2 = Compacta (C), Vilosa (V); 3 = Em nível (N), Abaixo (AB), Acima (AC); 4 = Branca (B), Branca com área central escura (BE); 5 = Normal (N), Hipertrofiada (H); 6 = Branca (B), Amarelada (Am), Avermelhada (Av); 7 = Normal (N), Elástico (EL), Esponjoso (ES).

Quadro 9 – Descrição das alterações encontradas durante artroscopia nas articulações tibiotársicas, de cinco cavalos, após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (tratado e controle) - São Paulo - 2009.

6.5 ANÁLISE DO FIBRINOGÊNIO

Os valores obtidos durante todo período experimental encontram-se dentro da normalidade para espécie, e não se observou diferença significativa quando se comparou os diferentes momentos de avaliação.

Os dados obtidos das concentrações plasmáticas de fibrinogênio estão demonstrados no apêndice kk e no gráfico 8.

Gráfico 8 – Valores médios do fibrinogênio plasmático obtidos em diferentes momentos, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* - São Paulo - 2009

6.6 ANÁLISE FÍSICA DO LÍQUIDO SINOVIAL

6.6.1 Aspecto

Observou-se alteração do aspecto do líquido sinovial no grupo tratado nos dias 21 (mediana 2) e 120 (mediana 3) quando comparado aos outros momentos de avaliação. No grupo controle a mediana aumentou nos dias 15 (mediana 3) e 21 (mediana 2), quando comparada aos outros momentos de avaliação. Entretanto, para ambos os grupos, não se observou diferenças significativas nos diferentes momentos de avaliação ($P>0,05$). Também não se observaram diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$).

Os dados obtidos do aspecto do líquido sinovial estão apresentados nos apêndices CC e DD, na tabela 9 e no gráfico 9.

Tabela 9 – Medianas dos escores do aspecto do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo - 2009.

DIAS	MEDIANA	
	GRUPO TRATADO	GRUPO CONTROLE
0	1 ^{aA}	1 ^{aA}
7	1 ^{aA}	1 ^{aA}
15	1 ^{aA}	3 ^{aA}
21	2 ^{aA}	2 ^{aA}
30	1 ^{aA}	1 ^{aA}
60	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}
90	1 ^{aA}	1 ^{aA}
120	3 ^{aA}	1 ^{aA}
150	1 ^{aA}	1 ^{aA}
180	1 ^{aA}	1 ^{aA}

Escores: 1 (límpido); 2 (semi-turvo); 3 (turvo)

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Escores: 1 (límpido); 2 (semi-turvo); 3 (turvo)

Gráfico 9 – Representação gráfica das medianas dos escores do aspecto do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo, 2010.

6.6.2 Coloração

Apesar de não se observar diferença estatística significativa entre os momentos de avaliação e entre os grupos controle e tratado, observou-se no grupo tratado aumento dos escores no dia 7 (mediana 2), 90 e 120 (mediana 3) do pós-operatório ($P > 0,05$). No grupo controle houve aumento dos escores nos dias 15 (mediana 2) e 90 (mediana 3) do pós-operatório ($P > 0,05$).

Os dados obtidos da coloração do líquido sinovial estão apresentados nos apêndices EE e DD, na tabela 10 e no gráfico 10.

Tabela 10 – Medianas dos escores da coloração do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo – 2009

DIAS	MEDIANA	
	GRUPO TRATADO	GRUPO CONTROLE
0	1 ^{aA}	1 ^{Aa}
7	2 ^{aA}	1 ^{aA}
15	1 ^{aA}	2 ^{aA}
21	1 ^{aA}	1 ^{aA}
30	1 ^{aA}	1 ^{aA}
60	1 ^{aA}	1 ^{aA}
90	3 ^{aA}	3 ^{aA}
120	3 ^{aA}	1 ^{aA}
150	1 ^{aA}	1 ^{aA}
180	1 ^{aA}	1 ^{aA}

Escores: 1 (amarelo claro); **2** (amarelo ouro); **3** (avermelhado)

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 10 – Representação gráfica das medianas dos escores da coloração do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo - 2009

6.6.3 Viscosidade

Comparando-se os diferentes momentos tanto para o grupo tratado como para o grupo controle, houve diminuição da viscosidade nos dias 7 e 15 (mediana 0) do pós-operatório quando comparado ao dia 0 (mediana 1, mediana 2 respectivamente). Entre os dias 21 e 150 observou-se melhora (mediana entre 0,5 e 1; mediana 1 e 2 respectivamente), e no dia 180 completa recuperação da viscosidade (mediana 2), sem relevância estatística ($P>0,05$)...

A viscosidade do líquido sinovial do grupo controle foi maior do que a do grupo tratado nos dias 21 e 60 ($p<0,05$).

Os dados obtidos do grau de viscosidade do líquido sinovial estão demonstrados nos apêndices GG e HH, na tabela 11 e no gráfico 11.

Tabela 11 – Medianas dos escores do grau de viscosidade do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo – 2009

DIAS	MEDIANA	
	GRUPO TRATADO	GRUPO CONTROLE
0	1 ^{abA}	2 ^{aA}
7	0 ^{aA}	0 ^{aA}
15	0 ^{aA}	0 ^{aA}
21	1 ^{abA}	2 ^{abB}
30	1 ^{abA}	1 ^{aA}
60	0,5 ^{abA}	1 ^{aB}
90	1 ^{abA}	2 ^{aA}
120	1 ^{abA}	1,5 ^{aA}
150	1 ^{abA}	1 ^{aA}
180	2 ^{bA}	2 ^{aA}

Graduação da viscosidade: boa (2 – fio com tamanho de 2,5 a 5 cm); regular (1- fio com tamanho menor que 2,5 cm); e ruim (0 - não há formação de fio).

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Gráfico 11 – Representação gráfica das medianas dos escores do grau de viscosidade do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo - 2009

6.6.4 Contagem global e diferencial das células do líquido sinovial

Durante análise estatística não se constatou diferença estatística significativa entre os diferentes momentos para cada grupo, e entre os grupos ($P > 0,05$).

De forma geral observou-se discreta celularidade do líquido sinovial no decorrer do período experimental. O líquido sinovial das articulações que apresentaram elevada quantidade de células (apêndice II e JJ), apresentou predomínio de neutrófilos com discreta atividade fagocitária.

Os dados obtidos da contagem global de células do líquido sinovial estão demonstrados nos apêndices II e JJ, na tabela 12 e no gráfico 12.

Tabela 12 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da contagem global de células (células/ μ l) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* e implante de gel QFG (tratado e controle) - São Paulo - 2009.

DIAS	GRUPO TRATADO		GRUPO CONTROLE	
	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP
0	72 ^{Aa}	52,63	106 ^{aA}	72,31
7	394 ^{aA}	548,95	228 ^{aA}	231,88
15	1036 ^{aA}	1256,6	928 ^{aA}	1176,3
21	273 ^{aA}	371,66	436 ^{aA}	492,21
30	422 ^{aA}	631,2	206 ^{aA}	141,52
60	50 ^{aA}	8,16	90 ^{aA}	46,9
90	135 ^{aA}	66,08	110 ^{aA}	70,71
120	20 ^{aA}	----	106 ^{aA}	85,04
150	15 ^{aA}	10	30 ^{aA}	0
180	48 ^{aA}	64,18	60 ^{aA}	63,63

Legenda: VI – volume insuficiente; CI – colheita improdutiva

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 12 – Representação gráfica dos valores médios da contagem global de células (células/ μ l) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo, 2010.

6.6.5 Dosagem da proteína do líquido sinovial e plasmática total

Referente ao grupo tratado observou-se elevação significativa nos níveis de proteína do líquido sinovial nos dias 7 ($p<0,01$) e 15 ($p<0,05$) do pós-operatório em relação ao dia 0. Houve diminuição significativa nos dias 60 ($p<0,05$), 120 ($p<0,05$), 150 ($p<0,01$), e 180 ($p<0,01$) do pós-operatório em relação ao dia 7. Também houve diminuição significativa nos dias 150 e 180 ($p<0,05$) do pós-operatório em relação ao dia 15.

Referente ao grupo controle, houve aumento significativo nos níveis de proteína do líquido sinovial no dia 7 comparado aos dias 90, 120, 150 e 180 do pós-operatório ($p<0,05$). Também houve aumento significativo no dia 15 comparado aos dias 90, 120, 150 e 180 ($p<0,05$) do pós-operatório.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Os dados obtidos dos níveis de proteína plasmática e do líquido sinovial estão demonstrados nos apêndices BB, LL e MM, na tabela 13, e no gráfico 13.

Tabela 13 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de proteína plasmática e do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo – 2009

DIAS	PT PLASMÁTICA		GRUPO TRATADO		GRUPO CONTROLE	
	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP
0	7,04 ^{ac}	0,35	1,23 ^{aA}	0,35	1,34 ^{abcA}	0,35
7	7,12 ^{ac}	0,33	3,93 ^{bA}	1,22	2,80 ^{aA}	1,20
15	7,24 ^a	0,38	3,59 ^{bcA}	1,40	2,75 ^{aA}	0,83
21	7,26 ^a	0,45	2,35 ^{abcA}	0,86	2,41 ^{abcA}	1,08
30	7,24 ^a	0,35	2,17 ^{abcA}	0,99	2,16 ^{abcA}	0,91
60	6,96 ^{abc}	0,35	1,40 ^{acA}	0,17	1,19 ^{abcA}	0,30
90	7,04 ^{ac}	0,32	2,38 ^{abcA}	2,84	0,88 ^{bcA}	0,03
120	6,56 ^b	0,16	0,88 ^{acA}	----	0,64 ^{bcA}	0,20
150	6,68 ^{bc}	0,32	0,58 ^{aA}	0,40	0,62 ^{bcA}	0,0
180	6,68 ^{bc}	0,23	0,88 ^{aA}	0,26	0,99 ^{bcA}	0,19

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Gráfico 13 – Representação gráfica dos valores médios dos níveis de proteína plasmática e do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (controle e tratado) - São Paulo - 2009.

6.6.6 Quantificação do Ácido Hialurônico e Condroitim Sulfato do líquido sinovial

Observou-se um grande declínio dos níveis de ácido hialurônico após a criação do defeito osteocondral, que perdurou por 30 dias no grupo tratado e 60 dias no grupo controle. A partir do dia 90 os níveis se elevaram em relação às amostras do dia 0 e se mantiveram elevadas até os 180 dias do pós-operatório, comportamento observado para ambos os grupos.

Para o grupo tratado, observou-se aumento significativo dos níveis de ácido hialurônico nos dias 150 ($p < 0,05$) e 180 ($p < 0,01$), quando comparado ao dia 7 do pós-operatório.

Para o grupo controle, observou-se aumento significativo dos níveis de ácido hialurônico nos dias 90 ($p < 0,05$), 120 ($p < 0,05$), e 180 ($p < 0,01$) quando comparado ao dia 7 do pós-operatório. Também houve aumento significativo do ácido hialurônico nos dias 90 ($p < 0,05$), 120 ($p < 0,05$), e 180 ($p < 0,05$), quando comparado ao dia 15 do pós-operatório.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Os dados obtidos dos níveis de ácido hialurônico e condroitim sulfato do líquido sinovial, estão apresentados nos apêndices de NN a QQ, nas tabelas 14 e 15, e nos gráficos 14 e 15.

Tabela 14 - Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de ácido hialurônico (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo - 2010.

DIAS	GRUPO TRATADO		GRUPO CONTROLE	
	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP
0	498,7 ^{abA}	94,1	536,9 ^{abA}	161,9
7	290,0 ^{aA}	78,2	214,1 ^{bA}	23,7
15	295,7 ^{abA}	111,9	325,08 ^{bA}	85,6
21	370,5 ^{abA}	75,2	334,6 ^{abA}	127,5
30	358,3 ^{abA}	146,1	343,6 ^{abA}	136,5
60	537,3 ^{abA}	119,3	302,4 ^{abA}	206,0
90	613,0 ^{abA}	188,8	543,3 ^{aA}	318,0
120	609,1 ^{abA}	186,1	548,3 ^{aA}	209,3
150	531,3 ^{bA}	146,3	636,5 ^{abA}	216,8
180	645,3 ^{bA}	114,1	686,8 ^{aA}	167,0

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 14 – Representação gráfica dos valores médios de ácido hialurônico (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (tratado e controle) - São Paulo - 2009

Referente ao condroitim sulfato, houve elevação das concentrações nas amostras dos dias 7, 15, 21 e 30, com diminuição no dia 60 e nova elevação nas amostras dos dias 90, 120, 150 e 180 do pós-operatório, para ambos os grupos.

Nota-se que os níveis do condroitim sulfato aos 180 dias estão elevados 2,5 vezes para o grupo tratado e 1,8 vezes para o grupo controle, quando comparado às amostras colhidas antes da criação do defeito osteocondral.

Para o grupo tratado houve elevação do condroitim sulfato quando se comparou o dia 21 do pós-operatório ao dia 0.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Tabela 15 – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de condroitim sulfato (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado e controle) - São Paulo - 2009.

DIAS	GRUPO TRATADO		GRUPO CONTROLE	
	MÉDIAS	DP	MÉDIAS	DP
0	21,3 ^{aA}	7,18	27,7 ^{aA}	7,89
7	54,9 ^{abA}	21,93	42,6 ^{aA}	14,52
15	40,3 ^{abA}	17,22	52,2 ^{aA}	19,60
21	66,7 ^{bA}	30,11	49,8 ^{aA}	22,85
30	42,7 ^{abA}	17,27	43,7 ^{aA}	11,57
60	34,7 ^{abA}	15,12	23,2 ^{aA}	14,03
90	47,7 ^{abA}	14,49	33,9 ^{aA}	9,27
120	48,7 ^{abA}	12,50	47,1 ^{aA}	19,37
150	57,7 ^{abA}	13,81	46,6 ^{aA}	20,23
180	53,1 ^{abA}	22,94	49,7 ^{aA}	24,30

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 15 – Representação gráfica dos valores médios dos níveis de condroitim sulfato (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* de ambos os membros (tratado e controle) - São Paulo - 2009

6.7 ANÁLISE DA CARTILAGEM ARTICULAR

6.7.1 Quantificação de proteoglicanos

Nos quadros 1 e 2 podemos observar que a quantidade de PG extraídos do tecido cartilágneo, 180 dias após a criação do defeito osteocondral por artroscopia foi menor que a mensurada no fragmento inicial, tanto para o grupo controle como tratado. Contudo, observamos que a quantidade de radiação detectada (cpm) foi similar entre os momentos, tanto para o grupo tratado como controle.

Os dados obtidos da quantificação de proteoglicanos estão apresentados nas tabelas 16 e 17 e nas figuras 10 e 11.

Tabela 16 – Valores de proteoglicanos (μg) extraídos do tecido e ^{35}S -PG (cpm) produzido em 24 horas, dos fragmentos cartilagíneos coletados por artroscopia de cinco cavalos nos dia 0 e 180 (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Dia 0			Dia 180		
	PG (Azul Toluidina)	^{35}S - PG (cpm)	cpm/ μg	PG (Azul Toluidina)	^{35}S - PG (cpm)	cpm/ μg
1	31,18	4778	153,22	19,78	11286	570,59
2	74,84	12570	167,94	39,80	3886	97,62
3	23,61	2248	95,24	10,47	2296	219,33
4	102,63	2106	20,52	0,00	0	-
5	11,12	1303	117,12	0,00	0	-
Média	48,68	4601,00	94,52	23,35	5822,36	249,35

Tabela 17 – Valores de proteoglicanos (μg) extraídos do tecido e ^{35}S -PG (cpm) produzido em 24 horas, dos fragmentos cartilagíneos coletados por artroscopia de cinco cavalos nos dia 0 e 180 (controle) - São Paulo, 2009

Cavalo	Dia 0			Dia 180		
	PG (Azul Toluidina)	^{35}S - PG (cpm)	cpm/ μg	PG (Azul Toluidina)	^{35}S - PG (com)	cpm/ μg
1	-	-	-	35,49	1484	41,83
2	56,23	3935	69,98	36,60	16067	439,02
3	51,07	1593	31,19	13,60	1646	120,99
4	51,87	1025	19,77	14,91	1109	74,36
5	36,43	5460	149,88	20,26	1524	75,23
Média	48,90	3003,21	67,70	24,17	4365,95	150,29

A coloração com azul de toluidina mostra proteoglicanos (PG) totais extraídos do tecido ou solubilizados no meio de cultura, enquanto que o radioautograma mostra os proteoglicanos sintetizados nas 24 horas de cultura (figuras 10 e 11).

Figura 10 – A: Eletroforese em gel de agarose. B: Radioautograma de ^{35}S -proteoglicanos derivados da cartilagem articular normal do cavalo 5 (dia 0). P: padrão de GAGs contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS), 5 μg cada; M: proteoglicano presente no meio de cultura; T: ^{35}S -proteoglicano sintetizado pelo tecido em 24h - São Paulo – 2009.

Figura 11 – A: Eletroforese em gel de agarose. B: Radioautograma de ^{35}S -proteoglicanos derivados da cartilagem articular do cavalo 5 (dia 180 do pós-operatório). P: padrão de GAGs contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS), $5\mu\text{g}$ cada; M: proteoglicano presente no meio de cultura; T: ^{35}S -proteoglicano sintetizado pelo tecido em 24h - São Paulo – 2009

6.7.2 Análise Morfológica / Histologia

A análise histológica dos defeitos ostecondrais após 180 dias revelou material amorfo contendo células mesenquimais com núcleos arredondados imersos em matriz extracelular, para o grupo tratado e controle (Figura 12).

Figura 12 – Fotomicrografia de biopsia de cartilagem articular do cavalo 3 antes e após o implante do gel de quitosana fosfato de glicerol. (A) antes do implante, mostrando cartilagem hialina sem alterações; (B) após o implante, mostrando material amorfo contendo células com características morfológicas fibroblastóides com núcleos arredondados imersos em matriz extracelular (H&E, barra = 100 µm).

7 DISCUSSÃO

7.1 EXAME FÍSICO

Durante avaliação física, especificamente na avaliação da claudicação e da mensuração da circunferência articular, apesar de ter ocorrido melhora gradativa e significativa até os 180 dias do pós-operatório, os valores obtidos ao término do período de avaliação não retornaram aos do pré-operatório, que ocorreu de forma semelhante para ambos os grupos. Portanto, a claudicação foi decorrente da criação do defeito osteocondral e não da presença do gel na articulação.

Nos casos de OCD tratados por curetagem da cartilagem, por via artroscópica, o tempo de recuperação é muito variável quando se analisa a presença de claudicação (BRINK et al., 2009) e este aspecto deve ser considerado nos trabalhos experimentais, pois os modelos de reparação de cartilagem utilizam defeitos criados e tratados no mesmo momento, e não são verificados os efeitos de substâncias que estarão presentes no processo articular crônico, quando da intervenção cirúrgica.

Hoemann et al. (2005), a exemplo do nosso trabalho, utilizaram o gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para preencher defeitos osteocondrais no fêmur de ovinos, porém, através da artrotomia. O tratamento analgésico no pós-operatório teve duração de duas semanas, e a claudicação foi observada em todos os carneiros por uma a três semanas. Apesar do acesso ter sido via artrotomia, diferentemente do que utilizamos em nosso trabalho, o tempo prolongado de terapia analgésica utilizado no trabalho de Hoemann et al. (2005) não foi suficiente para evitar a claudicação no pós-operatório inicial, e entendemos que a claudicação tenha ocorrido devido ao trauma da artrotomia, da criação dos defeitos e não atribuído exclusivamente à presença da quitosana na articulação. Os autores comentaram que na análise sanguínea e do fluído sinovial aos seis meses, não havia evidência de inflamação crônica.

Nos trabalhos de reparação da cartilagem articular em equinos, nota-se uma variação no tempo de manifestação da claudicação e efusão articular, e isto

pode estar relacionado ao período de tempo destinado à avaliação e a importância dada ao exame físico no pós-operatório. Para os cavalos com defeitos criados na tróclea femoral, Hurtig et al. (1988) avaliando os efeitos do tamanho e localização na reparação da cartilagem, utilizaram fenilbutazona na dose de 4 mg/kg no primeiro dia do pós-operatório, em dose única. Curiosamente e de maneira superficial, reportaram apenas claudicação leve a moderada durante o primeiro dia do pós-operatório. Os cavalos mantiveram atitude alerta e continuaram a se alimentar durante a primeira semana do pós-operatório, entretanto, relutaram em trotar por cinco dias. Desta forma, podemos constatar a presença de dor, e isto pode ser atribuído à criação do defeito osteocondral.

Sams e Nixon (1995) também se referiram de maneira superficial ao exame físico quando utilizaram o composto de colágeno e condrócito para preenchimento de defeitos osteocondrais, relatando mínima dor e efusão no pós-operatório. Fortier et al. (2002) utilizando o composto ácido polilático, fibrina, condrócitos e IGF-I para preenchimento de defeitos osteocondrais, e no grupo controle o mesmo composto com exceção do IGF-I, comentaram que não houve inflamação severa ou aumento de temperatura, dor ou edema no qual indicasse reação adversa ao enxerto de IGF-I ou mesmo no grupo controle, contudo, não há exposição de valores de claudicação ou outra forma de análise de dor.

Frisbie et al. (2009) utilizando critérios mais detalhados para avaliação física, observaram grau leve a moderado de efusão e claudicação até a décima semana após a criação de defeitos osteocondrais e preenchimento com condrócitos autólogos em cavalos, ocorrendo em todas as articulações tratadas.

Já no trabalho de Litzke et al. (2004), que por artrotomia criaram e preencheram os defeitos de cartilagem na tróclea lateral do *talus* com condrócito autólogo, foi utilizado flunixin meglumine por seis dias no pós-operatório, não sendo observado claudicação em nenhum cavalo ao passo e ao trote durante todo o período de avaliação. Supõe-se, neste caso, que o flunixin meglumine tenha sido suficiente para alívio da dor decorrente da artrotomia e não teve efeito sobre o defeito criado, tendo em vista que foi restrito apenas à cartilagem, sem atingir o osso subcondral, ou seja, não houve estímulo doloroso intenso.

Nixon et al. (1999), Fortier et al. (2001) e Wilke et al (2007) não comentaram sobre a avaliação física no pós-operatório.

7.2 EXAME RADIOGRÁFICO

Os resultados obtidos da avaliação radiográfica, no grupo tratado e controle, foram compatíveis com reparação do tecido ósseo.

Dos critérios utilizados (KIRKER-HEAD et al., 2000) para verificação de osteoartrite, o de maior graduação foi o critério 1, representado pelo aumento de volume dos tecidos moles peri-articulares, que diminuiu com o decorrer do tempo.

A presença de entesófitos observados no cavalo 1, e de osteófitos observados nos cavalos 1, 3 e 5, provavelmente tenha sido induzido pelo trauma cirúrgico, tendo em vista que são cavalos jovens e com grande facilidade de resposta e reparação aos estímulos traumáticos. Não se observaram outras alterações indicativas de processo degenerativo.

Para mensuração da área foi utilizado o programa Image J[®], que permitiu ampliar a imagem, facilitando traçar um contorno sobre a linha de transição entre a área radiotransparente do defeito e osso normal. Constatou-se que a deposição de tecido ósseo no defeito seguiu o mesmo padrão para ambos os grupos.

No início do experimento a área média do defeito diferiu entre os grupos, decorrente da dificuldade de criar um defeito padronizado de forma milimétrica.

Hurtig et al. (1988), Hendrickson et al. (1994), Nixon et al. (1999), Fortier et al. (2001), Fortier et al. (2002), Wilke et al. (2007) e Frisbie et al. (2009) realizaram defeito osteocondral, porém, não utilizaram o exame radiográfico para acompanhamento no pós-operatório. Apenas Litzke et al. (2004) e Frisbie et al. (2006) utilizaram o exame radiográfico para acompanhamento da reparação do defeito ósseo, porém, não realizaram a mensuração da área.

A avaliação radiográfica permitiu a identificação de três períodos na evolução do processo de reparação: o primeiro, do dia 1 ao 30 do pós-operatório, caracterizado por bordas bem definidas, regulares e maior radiotransparência do defeito. O segundo, entre os 60 e 90 dias, caracterizado pela presença de esclerose contornando o defeito, preenchimento de característica homogênea ou heterogênea, e diminuição da radiotransparência do defeito. O terceiro, entre os 120 e 180 dias, caracterizado por bordas pouco definidas e irregulares, presença de halo esclerótico mais evidente, e diminuição adicional da radiotransparência, com padrão homogêneo.

Ao final do experimento (180 dias) o processo de reparação estava inconcluso, constatado pela manutenção de radiotransparência na área do defeito diferente da observada no osso adjacente. Apesar de Litzke et al. (2004) terem criado o defeito apenas em cartilagem articular, ainda observaram, em alguns cavalos, radiotransparência do osso subcondral após dois anos da criação do mesmo. Isto nos leva a crer que o processo de reparação óssea dos defeitos criados nos cinco cavalos deste experimento, apresentará um tempo prolongado para resolução.

7.3 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO

Para a avaliação ultrassonográfica escolheu-se o recesso medial por apresentar, em condições normais, uma área preenchida por líquido sinovial e vilosidades sinoviais mais evidentes, conforme descrição de Vanderperren et al. (2009). A mensuração da área total do recesso medial e da área anecóica permitiu mensuração da distensão articular e caracterização do conteúdo.

A área do conteúdo anecóico se apresentou no decorrer do experimento de maneira semelhante para ambos os grupos, e aos 180 dias os valores estavam abaixo dos obtidos no pré-operatório. Houve uma tendência dos valores obtidos no pós-operatório serem menores no grupo tratado. Vale ressaltar que o conteúdo anecóico representa o líquido sinovial, e a diminuição dessa área não representa somente a diminuição da sua produção, mas também um possível aumento das vilosidades sinoviais que preenchem parte do recesso medial, o que deve ter ocorrido no presente estudo.

Houve um predomínio de conteúdo anecóico, ou seja, sem partículas em suspensão, no grupo controle. Pontos hiper-reflexivos foram notados no grupo tratado, caracterizando o aumento da celularidade do líquido sinovial. A quantidade de substância amorfa, representada pelo aumento das vilosidades sinoviais e fibrina, foi maior no grupo tratado. Portanto, constatou-se a presença de sinovite e efusão articular em ambos os grupos, com tendência a ser mais acentuado no grupo tratado.

Esse processo se resolveu no decorrer do experimento e não tendeu a cronicidade. Os achados ultrassonográficos se assemelham à descrição de Redding (2001). Na osteoartrite tipicamente há alterações peri-articulares, que se iniciam com congestão e espessamento da cápsula articular. A membrana sinovial torna-se hiperplásica e, em casos mais crônicos, a metaplasia do sinoviócito pode levar a formação de condromas sinoviais, os quais são vistos como nódulos na membrana. A presença de efusão sinovial facilita a avaliação da proliferação da membrana sinovial e seu espessamento. Em casos de sinovite severa, o fluido sinovial fibrinoso, celular ou hemorrágico, pode se tornar mais denso e comprometer a avaliação da cápsula articular e a sinóvia. A efusão associada com sinovite aguda é tipicamente anecóica, com acúmulo de fibrina ocasional. A hemorragia ou sepse aumentam a celularidade e a deposição de fibrina dentro da articulação e aparecem como fluido mais ecogênico.

Quanto à mensuração da área do defeito osteocondral em secção longitudinal e transversal, os valores obtidos foram semelhantes para ambos os grupos. Aos 180 dias não se observou preenchimento ou calcificação completa do defeito, sugerindo a necessidade de um período maior para reparação do tecido osteocondral, a exemplo do observado nas avaliações radiográficas.

A presença de predomínio de conteúdo heterogêneo e de característica hipoecogênica ou hiperecogênica nos defeitos no dia 1 do pós-operatório, para ambos os grupos, caracterizou a ausência da cartilagem articular removida durante a criação do defeito. Segundo Denoix e Busoni (1998) a cartilagem articular é representada por uma linha anecóica, fina e uniforme, entre a cápsula articular e o osso subcondral, que são representados por contornos ecogênicos. A ruptura na linearidade de alguma das estruturas pode representar uma lesão (RELAVE et al, 2009).

O predomínio de conteúdo heterogêneo no preenchimento do defeito osteocondral caracterizou a reparação incompleta, e a presença de áreas anecóicas talvez se deva a presença de áreas de tecido cartilágneo.

Litzke et al. (2004), trabalhando com defeitos cartilagíneos na tróclea do *talus* e implante de condrócitos autólogos, realizaram avaliação ultrassonográfica no pré-operatório, aos dois meses, um ano e dois anos após a criação do defeito. Com um e dois anos após o transplante não foram detectados defeitos na cartilagem.

7.4 EXAME ARTROSCÓPICO

A escolha por realizar os defeitos osteocondrais na tróclea lateral do *talus*, diferentemente do modelo femoropatelar (HURTIG et al., 1988; HENDRICKSON et al., 1994; NIXON et al., 1999; FORTIER et al., 2001; FORTIER et al., 2002; HOEMANN et al., 2005; WILKE et al., 2007; FRISBIE et al., 2009) foi para verificar a capacidade de reparação tecidual de uma das estruturas mais acometidas por osteocondrite dissecante, além de receber carga e ser uma articulação exigida em movimentos de flexão e extensão. Segundo Relave et al. (2009), a articulação tibiotársica é a mais acometida por osteocondrose e os locais de maior ocorrência são a crista intermédia distal da tíbia, seguida pela tróclea lateral do *talus*, o maléolo medial da tíbia, e mais raramente a tróclea medial do *talus*.

Neste estudo foram criados defeitos agudos, tratados no mesmo procedimento, não devendo extrapolar os resultados para casos clínicos ou experimentais que apresentam alterações crônicas, conforme lembrado por Schmidt et al. (2006).

Os defeitos realizados nas articulações dos eqüinos deste estudo foram caracterizados por Redman et al. (2005) como defeitos de espessura total ou defeito osteocondral, que envolve a remoção da cartilagem e do osso subcondral. Outro modelo é o defeito de espessura parcial ou defeito de cartilagem, caracterizado pela remoção apenas da cartilagem articular e se assemelha às fissuras observadas durante o estágio inicial da osteoartrite.

A criação de defeitos osteocondrais resulta em um processo de reparação inferior à cartilagem hialina normal e, a exemplo do realizado neste experimento, pode ser considerado um bom modelo para utilização dos diferentes tratamentos e comprovação da sua eficácia. Hunziker e Driesang (2003) descreveram a seqüência de acontecimentos durante a reparação intrínseca dos defeitos osteocondrais. Uma vez criado o defeito e a penetração no osso subcondral, diferentes tipos celulares são expostos e em abundância, tais como os pericitos, as células tronco mesenquimais perivasculars, hemopoiéticas, sanguíneas, as do endotélio vascular e as adiposas. Essas células não são apenas responsáveis em liberar substâncias no local, mas desencadeiam o aparecimento de processos angiogênicos e osteogênicos desordenados. Após a estimulação dos fatores de crescimento, os

vasos sanguíneos se desenvolvem rapidamente a partir do fundo do defeito e rapidamente as condições biológicas se tornam desfavoráveis à condrogênese e condução da osteogênese. Segundo Nixon e Fortier (2001), além da profundidade do defeito, o tamanho, a exposição do local do defeito, a maior ou menor carga de peso, além da idade do animal, influenciam na reparação e resistência da superfície da cartilagem neoformada.

A área do defeito também deve ser considerada nos modelos de reparação. Neste experimento foi estipulada a criação de defeitos circulares com área de $0,5 \text{ cm}^2$. Hurtig et al. (1988) verificaram que lesões maiores de 15 mm^2 tendem a apresentar boa reparação aos cinco meses, mas degeneram-se com o passar do tempo. Convery et al. (1972) verificaram que lesões na articulação femorotibial do equino menores de 3,0 mm de diâmetro cicatrizaram com pouca deformidade residual. Portanto, a reparação dos defeitos osteocondrais no cavalo pode não ser satisfatória ou completa, contrariamente ao documentado para cães e roedores, que apresentam reparação com cartilagem hialina (NIXON; FORTIER, 2001).

O preenchimento completo por tecido de reparação de todos os defeitos do grupo tratado, observado durante artroscopia aos 180 dias, sugere um efeito do gel na retenção mecânica do sangue originado do osso subcondral, mantendo-o no leito do defeito. Desta forma, as células pluripotentes provenientes do osso subcondral permaneceriam por tempo maior e promoveriam a formação do tecido de reparação. Esta observação pode ser considerada uma especulação, tendo em vista que os dois defeitos do grupo controle não preenchidos por completo, apresentavam menos de um terço da área desprovida de tecido de reparação.

A textura da superfície do tecido de reparação era de aspecto viloso em parte ou em toda área dos defeitos, e provavelmente seja devido à carga imposta sobre as superfícies articulares. Hurtig et al (1988) observaram, cinco meses após a criação dos defeitos, fissuras entre o tecido de reparação e o osso subcondral, que se tornaram *flaps* de tecido fibroso por influência de forças biomecânicas normais, resultando em exposição do osso subcondral. Foi sugerido que a superfície articular oposta ficaria mais propensa a se projetar para dentro dos grandes defeitos, colidindo no frágil tecido de reparação, e resultando em sua ruptura. Portanto, um efeito inevitável de carga em grandes defeitos será deletério.

O gel não foi detectado em nenhum dos defeitos tratados durante o exame aos seis meses, indo ao encontro de outros trabalhos que indicaram que a quitosana é facilmente degradada (RAO; SHARMA, 1997) e depurada (LEE et al., 1995).

7.5 EXAME HISTOLÓGICO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DA CARTILAGEM

Na análise histológica os tecidos da biópsia não demonstraram diferenças morfológicas entre os grupos, e estavam compostos por material amorfo contendo células com características morfológicas fibroblastóides com núcleos arredondados imersas em matriz extracelular, de orientação aleatória.

Pelas características descritas pode ser que uma parte dessas células sejam mesenquimais e se diferenciem em condrócitos ou fibroblastos. Para identificação do tipo celular é necessária a análise imunoistoquímica, que será realizada futuramente.

Hurtig et al. (1988), analisando o tecido de reparação de defeitos cicatrizados espontaneamente, observaram no primeiro mês proliferação mesenquimal e vascular extrínseca, com predomínio de células mesenquimais com grandes núcleos de origem subcondral. Entre os 75 dias e quatro meses houve aumento no número e organização de fibras de colágeno, que juntamente com um núcleo de fibroblastos maduros estavam orientadas paralelas à superfície articular. Aos cinco meses havia aumento adicional na quantidade e organização de tecido fibroso denso e pequenos aglomerados de condrócitos. Aos nove meses havia mais áreas preenchidas, condrócitos em lacuna, e predomínio de tecido fibroso maduro.

Em nosso trabalho, a aparência histológica do tecido de reparação se assemelha ao observado em outros trabalhos que mantiveram os defeitos vazios (SAMS; NIXON, 1995; FORTIER et al., 2001; LITZKE et al., 2004; FRISBIE et al., 2009) ou que preencheram os defeitos com suporte de ácido polilático e fibrina (NIXON et al., 1999), ácido polilático, fibrina e condrócitos (FORTIER et al., 2002); fibrinogênio (WILKE et al., 2007); ou que utilizaram apenas o suporte de

polidioxanona (FRISBIE et al., 2009), no qual constataram a presença de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso.

Na quantificação dos proteoglicanos por densitometria observou-se quantidade inferior no tecido de reparação quando comparado à cartilagem normal, extraída antes da criação dos defeitos.

Na avaliação de proteoglicanos, Hurtig et al. (1988) obtiveram maior produção de proteoglicanos em defeitos pequenos quando comparado aos grandes. Houve maior produção de proteoglicanos na cartilagem distante do defeito comparado ao tecido de reparação dentro ou na periferia do defeito. Se o proteoglicano e colágeno são necessários para prover resistência e viscoelasticidade à superfície articular, a cartilagem com quantidade inferior receberá carga biomecânica normal e poderá resultar em danos ao tecido de reparação, degeneração fibrosa e destacamento.

A baixa produção de proteoglicanos corrobora com a descrição das características histológicas, indicando qualidade inferior do tecido de reparação comparado à cartilagem normal. Resultados semelhantes foram observados por Nixon et al. (1999), Fortier et al. (2001), Fortier et al. (2002), e Wilke et al. (2007),

7.6 LÍQUIDO SINOVIAL

As alterações observadas no aspecto, coloração, e viscosidade do líquido sinovial foram semelhantes para ambos os grupos. O aspecto e a coloração sofreram alterações durante a colheita do líquido sinovial devido à contaminação com sangue.

Quanto à viscosidade, ela está diretamente relacionada ao conteúdo de ácido hialurônico (TULAMO et al., 1994; TULAMO et al., 1996; SUGIUCHI et al., 2005), e a diminuição observada nos dias 7 e 15 do pós-operatório foi decorrente da criação do defeito osteocondral. Constata-se que para níveis de ácido hialurônico abaixo de 325 ug/ml, não há formação de fio viscoso.

Segundo Sugiuchi et al. (2005), na presença de inflamação, as enzimas no líquido sinovial quebram a molécula de hialuronato, o volume de líquido sinovial aumenta e a viscosidade diminui. Neste trabalho, a elevação nos níveis de proteína

do líquido sinovial nos dias 7 e 15 do pós-operatório (gráfico 5) são indicativos da ocorrência de inflamação, correspondendo a valores entre 50% e 55% da proteína plasmática para o grupo tratado, e entre 37% e 39% para o grupo controle. Para Curtiss (1964), o líquido sinovial normal contém aproximadamente 30% do valor da proteína plasmática, sendo o conteúdo protéico normalmente menor que 2,5 g/dL. Segundo Nilsson e Persson (1973) a elevação do conteúdo protéico está correlacionada às lesões na cartilagem e membrana sinovial.

O aumento da circunferência articular pode ser atribuído ao processo inflamatório decorrente da criação do defeito articular, e no grupo tratado foi mais perceptível. Entretanto, esse aumento da circunferência articular perdurou por um período maior quando comparado aos valores da proteína do líquido sinovial, sendo indicativo que o processo inflamatório intra-articular se resolveu com maior rapidez, e o aumento da circunferência articular foi decorrente não só do processo inflamatório intra-articular, mas também do aumento do tecido peri-articular.

Referente à contagem global de leucócitos, Latimer et al. (2000) consideraram normal até 1000 células/ul de líquido sinovial. Apesar das médias obtidas estarem dentro dos valores de normalidade para o grupo controle e levemente aumentada para o grupo tratado, esses valores não são representativos dos grupos, mas de elevações individuais dos cavalos 1 e 3 para o membro tratado, e dos cavalos 3 e 4 para o membro controle, fato constatado pelo alto valor obtido do desvio padrão nos dias 7, 14, 21 e 30 do pós-operatório. Após esse período, os valores obtidos foram semelhantes aos valores do pré-operatório para ambos os grupos.

Neste trabalho, apesar das elevações serem individuais, as médias obtidas para contagem de leucócitos no período de 30 dias do pós-operatório são inferiores ao encontrado por Nixon et al. (1999), que obtiveram no dia 7 do pós-operatório média de 2050 células/ μ l em defeitos preenchidos com ácido polilático e fibrina em cavalos. Também foi inferior aos resultados obtidos por Wilke et al. (2007) nos dias 4 e 7 do pós-operatório, com média de 2320 células/ μ l em defeitos preenchidos com fibrinogênio e células tronco mesenquimais em cavalos. Fortier et al. (2002) observaram elevação da quantidade de células aos 4 e 7 dias do pós-operatório em defeitos preenchidos com ou sem IGF-I em cavalos, mas não publicaram os valores obtidos. Hoemann et al. (2005) não observaram alterações significativas em defeitos que receberam quitosana e fosfato de glicerol quando

comparado ao grupo controle em ovinos, e também não demonstraram os valores obtidos na publicação dos resultados.

Neste trabalho, a quitosana utilizada possuía grau de desacetilação superior a 75% e observou-se uma tendência ao aumento da quantidade de células do líquido sinovial no grupo tratado nos dias 7 e 15, sugerindo resposta inflamatória mais intensa estimulada pela presença da quitosana. Simard et al. (2009), observaram em um estudo *in vitro*, que a quitosana desacetilada a 80% foi mais quimiotática para neutrófilos comparado a quitosana desacetilada a 95%, e a maioria dos efeitos quimiotáticos foi mediado por lipídeos bioativos derivados da fosfolipase A2, não ativando a degranulação e a produção de superóxido. Segundo Simard et al. (2009), em contraste com as idéias tradicionais que a persistência de polimorfonucleares é deletéria na reparação de feridas, a persistência de polimorfonucleares durante as primeiras semanas de reparação está relacionada ao resultado favorável de reparação da cartilagem.

Dentre os trabalhos de pesquisa que utilizaram o cavalo como modelo animal para criação de defeitos articulares (HURTIG et al, 1988; HENDRICKSON et al, 1994; NIXON et al, 1999; FORTIER et al, 2002; LITZKE et al, 2004; HOEMANN et al, 2005; WILKE et al, 2007; FRISBIE et al, 2009), poucos avaliaram a cinética do ácido hialurônico e do condroitim sulfato no líquido sinovial visando sua utilização como indicadores do processo de reparação da cartilagem articular.

Referente à quantificação do ácido hialurônico no líquido sinovial, a diminuição dos níveis nas amostras colhidas nos dias 7, 15, 21 e 30, do pós-operatório, pode ser atribuída à liberação de citocinas, advindas do defeito osteocondral e da membrana sinovial, que se tornou inflamada. Acredita-se que a produção de ácido hialurônico de baixo peso molecular associado à efusão articular levou à diminuição na sua concentração no líquido sinovial. Como maior produto das células sinoviais, o ácido hialurônico é considerado um marcador de sinovite, e é encontrado na matriz da cartilagem em menor proporção comparado com a síntese pelos sinoviócitos. Se a membrana está inflamada, existe um aumento da secreção internamente a ela e no tecido circundante, em vez de estar dentro do espaço articular, acarretando dor e rigidez (GARNERO et al., 2000).

A criação de defeitos na cartilagem leva ao aumento de óxido nítrico, que por sua vez catalisa a interleucina-I (IL-I), ativa as metaloproteinases da matriz e induz a inibição da síntese de proteoglicanos. A remoção do ácido hialurônico e da

cartilagem degradada ocorre pelos vasos linfáticos ou por degradação local (GARNERO et al., 2000), tornando-se mais acelerado na presença da inflamação articular aguda (BERTONE et al., 2001). A concentração e tamanho do ácido hialurônico estão reduzidos na osteoartrite, fato constatado pela produção de ácido hialurônico de baixo peso molecular em articulações normais de humanos, atingindo massa molecular de 20×10^6 daltons, enquanto na artrite reumatóide apresenta peso molecular médio de apenas $4,8 \times 10^6$ daltons (DAVID-RAOUDI et al., 2009). Segundo Antonas et al. (1973) a depuração dos glicosaminoglicanos ocorre mais rapidamente na presença de inflamação.

O aumento dos níveis de ácido hialurônico observado aos 60 dias nas amostras do grupo tratado, e aos 90 dias nas amostras do grupo controle, e que se mantiveram elevadas acima dos valores do pré-operatório até os 180 dias, são indicativos de processo anabólico visando a reparação tecidual. Fato constatado pelos resultados obtidos de outros exames no período experimental, e que demonstraram melhoria do ambiente articular, tais como: diminuição da contagem global de leucócitos e dos níveis de proteína do líquido sinovial aos 30 dias, melhoria da viscosidade do líquido sinovial, e início da diminuição da circunferência articular aos 60 dias, que se manteve em declínio até os 180 dias do pós-operatório.

A elevação dos níveis do ácido hialurônico aos 60 dias no grupo tratado sugere uma antecipação do processo de reparação comparado ao grupo controle. Para ambos os grupos nota-se a manutenção de níveis elevados do ácido hialurônico aos 180 dias do pós-operatório, sugerindo que o processo de reparação não se finalizou e as colheitas deveriam se estender por período maior. Outra hipótese seria uma influência da mobilidade e suporte de peso sobre o defeito na tróclea lateral do *talus*, obtendo-se uma reparação inferior e que manteria o estímulo, produzindo níveis levemente elevados de ácido hialurônico.

Buscando semelhanças com outras espécies, encontramos o trabalho de Nganvongpaint et al. (2009) que avaliaram antes da criação do defeito osteocondral e a cada seis semanas o condroitim sulfato e o ácido hialurônico do soro de cães submetidos a dois modelos de reparação de cartilagem articular, um com implante de condrócito autólogo e o outro com perfurações no osso subcondral. Os autores verificaram correlação positiva entre níveis de AH no soro e um escore melhor de reparação da cartilagem, sugerindo ser um bom marcador para indicação da homeostasia intra-articular.

Semelhante ao que ocorreu em nosso trabalho, porém, na avaliação do soro, Nganvongpaint et al. (2009) detectaram aumento da concentração de CS após a criação e preenchimento do defeito por 12 semanas, que coincidiu com o período de reparação da cartilagem nestes cães. Após este período, a concentração diminuiu próxima aos valores basais. No grupo que sofreu perfurações do osso subcondral a concentração de CS tendeu a aumentar, e coincidiu com reparação inferior da cartilagem, que levou a osteoartrite secundária. Na 24ª semana, as cartilagens com melhor escore de reparação apresentaram baixos níveis de CS no soro.

Diferentemente do nosso trabalho, Nixon et al. (1999) constataram elevação não significativa na concentração de ácido hialurônico nos dias 14 e 30 após a cirurgia para ambos os grupos. Segundo os autores, é sabido que a concentração de AH declina na sinovite crônica e na osteoartrite, e justificaram que a manutenção das concentrações durante todo o experimento evidenciou que a fibrina e o IGF – 1 foram bem toleradas no ambiente articular.

Também utilizando IGF – 1 associado ao suporte de fibrina e condrócitos, e semelhante ao comportamento observado em nosso trabalho, Fortier et al. (2002) verificaram diminuição no conteúdo de ácido hialurônico nos dias 4 e 7, retornando aos valores do pré-operatório no dia 21, entretanto, essa alteração não foi significativa estatisticamente entre os momentos e grupos. Segundo os autores esta variação é compatível com o pós-operatório de cavalos submetidos a artroscopia.

Referente à quantificação do condroitim sulfato no líquido sinovial, os níveis elevados nos dias 7, 15, 21 e 30 do pós-operatório, comparado a amostra do dia 0, podem ser decorrentes da presença do defeito osteocondral e da artrocentese. Aos 60 dias, a diminuição aos níveis próximos do pré-operatório caracterizou a diminuição do processo inflamatório, e a nova elevação dos níveis a partir do dia 90 até o 180 do pós-operatório caracterizou a manutenção do processo de reparação.

Van Den Boom et al. (2005), observaram elevação dos níveis de glicosaminoglicanos após repetição da artrocentese em articulações metacarpofalangeana e radiocarpiana normais, aumentando os níveis cerca de 1,5 e 1,7 vezes, respectivamente. Os níveis retornaram ao normal após uma semana. A artrocentese não teve efeito sobre os níveis de glicosaminoglicanos para a articulação tibiotársica. Segundo Fuller et al. (1996), a concentração de

glicosaminoglicanos pode estar relacionada ao tamanho da articulação, quanto menor a articulação maior serão os níveis de glicosaminoglicanos.

No trabalho de Van Den Boom et al. (2005) os glicosaminoglicanos do líquido sinovial foram quantificados utilizando o azul 1,9 dimetilmetileno, e segundo McIlwraith (2005), com esta análise se identifica apenas os glicosaminoglicanos sulfatados, excluindo, portanto, o ácido hialurônico. Desta forma, provavelmente, a maior concentração de glicosaminoglicanos quantificada foi a de condroitim sulfato.

Hurtig et al. (1988), Hoemann et al. (2005), Frisbie et al. (2006), Wilke et al. (2007), e Frisbie et al. (2009), não analisaram os glicosaminoglicanos do líquido sinovial após criação de defeitos articulares.

8 CONCLUSÃO

O gel de quitosana – fosfato de glicerol é biocompatível com o ambiente articular e pode ser indicado para futuras aplicações como suporte de células e para liberação controlada de medicamentos.

REFERÊNCIAS

- ANTONAS, K. N.; FRASER, J. R.; MUIRDEN, K. D. Distribution of biologically labelled radioactive hyaluronic acid injected into joints. **Ann Rheum Dis.**, v. 32, n. 2, p. 103 – 111, 1973.
- BERTONE, A. L.; PALMER, J. L.; JONES, J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. **Veterinary Surgery**, v. 30, p. 528 – 538, 2001.
- BRINK, P.; DOLVIK, N. I.; TVERDAL, A. Lameness and effusion of the tarsocrural joints after arthroscopy of osteochondritis dissecans in horses. **Veterinary Record**, v. 165, p. 709 – 712, 2009.
- CHENITE, A.; CHAPUT, C.; WANG, D.; COMBES, C.; BUSCHMANN, M. D.; HOEMANN, C. D.; LEROUX, J. C.; ATKINSON, B. L.; BINETTE, F. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, v. 21, n. 21, p. 2155 – 2161, 2000.
- CONVERY, F. R.; AKESON, W. H.; KEOWN, G. H. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 82, p. 253 - 262, 1972.
- CUI, Y. L.; QI, A. D.; LIU, W. G.; WANG, X. H.; WANG, H.; MA, D. M.; YAO, K. D. Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3859 – 3868, 2003.
- CURTISS, P. H. Changes produced in the synovial membrane and synovial fluid by disease. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 46, p. 873 – 888, 1964.
- DAVID-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.
- DECHANT, J. E.; BAXTER, G. M.; FRISBIE, D. D.; TROTTER, G. W.; McILWRAITH, C. W. Effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulphate, alone and in combination, on normal and interleukin-1 conditioned equine articular cartilage explant metabolism. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p. 227 – 231, 2005.

DENOIX, J. M.; BUSONI, V. Ultrasonography of joints and synovia. In: WHITE, N.A., MOORE, J.N. **Current Techniques in Equine Surgery and Lameness**, 2 ed. Philadelphia. W.B. Saunders Co., p. 643 - 654.

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.

DORNA, V.; GUERRERO, R. C. Effects of oral and intramuscular use of chondroitin sulfate in induced equine aseptic arthritis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 18, n. 10, p. 548 – 552, 1998.

FORTIER, L. A.; MOHAMMED, H. O.; LUST, G.; NIXON, A.J. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. **Journal Bone Joint Surg.**, v. 84, n. 2, p. 276 – 288, 2002.

FORTIER, L. A.; BALKMAN, C. E.; SANDELL, L. J.; RATCLIFFE, A.; NIXON, A. J. Insulin-like growth factor-1 gene expression patterns during repair of acute articular cartilage injury. **Journal Orthopedic Research**, v. 19, p. 720 – 728, 2001.

FORTIER, L. A.; DEAK, M. M.; SEMEVOLOS, S. A.; CERIONE, R. A. Insulin-like growth factor-I diminishes the activation status and expression of the small GTPase Cdc42 in articular chondrocytes. **Journal of Orthopedic Research**, v. 22, p. 436 - 445, 2004.

FOSTER, J. B. T.; DeNATALE, A.; DOTTI, L. B. Determination of plasma fibrinogen by means of centrifugation after healing. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 31, n. 1, p. 42 – 45, 1959.

FRANCIS SUH, J. K.; MATTHEW, W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v. 21, p. 2589 – 2598, 2000.

FRENKEL, S. R.; BRADICA, G.; BREKKE, J. H.; GOLDMAN, S. M.; IESKA, K.; ISSACK, P.; BONG, M. R.; TIAN, H.; GOKHALE, J.; COUTTS, R. D.; KRONENGOLD, R. T. Regeneration of articular cartilage-evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 13, n. 9, p. 798 – 807, 2005.

FRISBIE, D. D.; LU, Y.; KAWCAK, C. E.; DICARLO, E. F.; BINETTE, F.; McILWRAITH, C.W. In vivo evaluation of autologous cartilage fragment-loaded scaffolds implanted into equine articular defects and compared with autologous chondrocyte implantation. **Am J Sports Med.**, v. 37, p. 71 - 80, 2009.

FRISBIE, D. D.; MORISSET, S.; HO, C. P.; RODKEY, W. G.; STEADMAN, J. R.; MCILWRAITH, C. W. Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. **Am J Sports Med.**, v. 34, n. 11, 2006.

FULLER, C. J.; BARR, A. R.; DIEPPE, P. A.; SHARIF, M. Variation of an epitope of keratan sulphate and total glycosaminoglycans in normal equine joints. **Equine Vet J.**, v. 28, n.6, p. 490 – 493, 1996.

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

HUNZIKER, E. B.; DRIESANG, I.M. Functional barrier principle for growth-factor-based articular cartilage repair. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 11, n. 5, p. 320 – 327, 2003.

HENDRICKSON, D. A.; NIXON, A. J.; GRANDE, D. A.; TODHUNTER, R. J.; MINOR, R. M.; ERB, H.; LUST, G. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. **J Orthop Res.**, v. 12, n. 4, p. 485 – 497, 1994.

HENSON, F. M.; DAVENPORT, C.; BUTLER, L.; MORAN, I.; SHINGLETON, W. D.; JEFFCOTT, L. B.; SCHOFIELD, P. N. Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n.6, p. 441 - 447, 1997.

HOEMANN, C. D.; HURTIG, M.; ROSSOMACHA, E.; SUN, J.; CHEVRIER, A.; SHIVE, M. S.; BUSCHMANN, M. D. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 87, n. 12, p. 2671 - 2686, 2005.

HSU, S. H.; WHU, S. W.; HSIEH, S. C.; TSAI, C. L.; CHEN, D. C.; TAN, T. S. Evaluation of chitosan-alginate-hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration. **Artif Organs.**, v. 28, n. 8, p. 693 - 703, 2004.

HURTIG, M. B.; FRETZ, P. B.; DOIGE, C. E.; SCHNURR, D. L. Effects of Lesion Size and Location on Equine Articular Cartilage Repair. **Can J Vet Res.**, v. 52, p. 137 - 146, 1988.

INOUE, A.; TAKAHASHI, K. A.; ARAI, Y.; TONOMURA, H.; SAKAO, K.; SAITO, M.; FUJIOKA, M.; FUJIWARA, H.; TABATA, Y.; KUBO, T. The therapeutic effects of basic fibroblast growth factor contained in gelatin hydrogel microspheres on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. **Arthritis & Rheumatism.** v. 54, n. 1, p. 264 – 270, 2006.

IWASAKI, N.; YAMANE, S. T.; MAJIMA, T.; KASAHARA, Y.; MINAMI, A.; HARADA, K.; NONAKA, S.; MAEKAWA, N.; TAMURA, H.; TOKURA, S.; SHIONO, M.; MONDE, K.; NISHIMURA, S. Feasibility of polysaccharide hybrid materials for scaffolds in cartilage tissue engineering: evaluation of chondrocyte adhesion to polyion complex fibers prepared from alginate and chitosan. **Biomacromolecules.** v. 5, n. 3, p. 828 – 833, 2004.

JAQUES, 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.

JAIN, N. C. **Schalm`s veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221 p.

KIM, S. E.; PARK, J. H.; CHO, Y. W.; CHUNG, H.; JEONG, S. Y.; LEE, E. B.; KWON, I. C. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering. **J Control Release.**, v. 91, n. 3, p. 365 – 374, 2003.

KIRKER-HEAD, C. A.; CHANDNA, V. K.; AGARWAL, R. K.; MORRIS, E. A.; TIDWELL, A.; O'CALLAGHAN, M. W.; RAND, W.; KUMAR, M. S. Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. **Am J Vet Res.**, v. 61, n.6, p. 714 – 718, 2000.

KUO, Y.C.; HSU, Y.R. Tissue-engineered polyethylene oxide/chitosan scaffolds as potential substitutes for articular cartilage. **J Biomed Mater Res A.**, v. 91, n. 1, p. 277 – 287, 2009.

LATIMER, F. G.; KANEPS, A. T.; PASQUINI, C. Stifle disease in horses. **Compendium Continuous Education Practice Veterinary**, v. 22, n. 4, p. 381 – 390, 2000.

LEE, J. E.; KIM, K. E.; KWON, I. C.; AHN, H. J.; LEE, S. H.; CHO, H.; KIM, H. J.; SEONG, S. C.; LEE, M. C. Effects of the controlled-released TGF-beta 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen / chitosan / glycosaminoglycan scaffold. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4163 – 4173, 2004.

LEE, K. Y.; HA, W. S.; PARK, W. H. Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives. **Biomaterials**, v. 16, n.16, p. 1211 – 1216, 1995.

LI, Z.; ZHANG, M. Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. **J Biomed Mater Res A**, v. 75, n. 2, p. 485 – 493, 2005.

LITZKE, L. F.; WAGNER, E.; BAUMGAERTNER, W.; HETZEL, U.; JOSIMOVIĆ - ALASEVIĆ, O.; LIBERA, J. Repair of Extensive Articular Cartilage Defects in Horses by Autologous Chondrocyte Transplantation. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 57 – 69, 2004.

LIU, S. Q.; QIU, B.; CHEN, L. Y.; PENG, H.; DU, Y. M. The effects of carboxymethylated chitosan on metalloproteinase-1, -3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression in cartilage of experimental osteoarthritis. **Rheumatol Int.**, v. 26, n. 1, p. 52 – 57, 2005.

LU, J. X.; PRUDHOMMEAUX, F.; MEUNIER, A.; SEDEL, L.; GUILLEMIN, G. Effects of chitosan on rat knee cartilages. **Biomaterials**, v. 20, n. 20, p. 1937 – 1944, 1999.

MARCHAND, C.; RIVARD, G. E.; SUN, J.; HOEMANN, C. D. Solidification mechanisms of chitosan-glycerol phosphate/blood implant for articular cartilage repair. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 17, n. 7, p. 953 – 960, 2009.

MATTIOLI-BELMONTE, M.; GIGANTE, A.; MUZZARELLI, R. A.; POLITANO, R.; DE BENEDITTIS, A.; SPECCHIA, N.; BUFFA, A.; BIAGINI, G.; GRECO, F. N,N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage. **Med Biol Eng Comput.**, v. 37, n.1, p. 130 – 134, 1999.

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. General pathobiology of the joint and response to injury. In: McILWRAITH, C.W., TROTTER, G.W. **Joint Disease in the Horse**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 40 – 69.

McILWRAITH, C. W. Diseases of joints, tendons, ligaments and related structures. In: **Adam's lameness in horses**. 5 ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2002. p. 459 – 479.

MONTEMBault, A.; TAHIRI, K.; KORWIN - ZMIJOWSKA, C.; CHEVALIER, X.; CORVOL, M. T.; DOMARD, A. A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. **Biochimistry**, v. 88, n. 5, p. 551 – 564, 2006.

NGANVONGPANIT, K.; POTHACHAROEN, P.; CHAOCHIRD, P.; KLUNKLIN, K.; WARRIT, K.; SETTAKORN, J.; PATTAMAPASPONG, N.; LUEVITOONVECHKIJ, S.; ARPORNCHAYANON, O.; KONGTAWELERT, P.; PRUKSAKORN, D. Prospective evaluation of serum biomarker levels and cartilage repair by autologous chondrocyte transplantation and subchondral drilling in a canine model. **Arthritis Research & Therapy**. v. 11, n. 3, p. 1 – 9, 2009.

NILSSON, G.; PERSSON, L. Changes in the synovial fluid of equine fetlock joints with lesions in the cartilage and joint capsule. A study in the standardbred horse. **Acta Vet Scand.**, v. 44, p. 99 – 107, 1973.

NIXON, A.; FORTIER, L. A. New Horizons in Articular Cartilage Repair. **AAEP PROCEEDINGS**, v. 47, p. 217 – 226, 2001.

NIXON, A.; FORTIER, L. A.; WILLIAMS, J.; MOHAMMED, H. Enhanced Repair of Extensive Articular Defects by Insulin-like Growth Factor-I-laden Fibrin Composites **Journal of Orthopaedic Research**, v. 17, n. 4, p. 475 – 487, 1999.

PALMER, J.; BERTONE, A. L. Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, p. 263 – 277, 1994.

PARK, K. M.; LEE, S. Y.; JOUNG, Y. K.; NA, J. S.; LEE, M. C.; PARK, K. D. Thermosensitive chitosan - Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. **Acta Biomater.**, v. 5, n. 6, p. 1956 – 1965, 2009.

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.

POOLE, A. R.; PIDOUX, I.; REINER, A.; ROSENBERG, L. An immunoelectron microscope study of the organisation of proteoglycan monomer, link protein and collagen in the matrix of the articular cartilage. **J Cell Biol.**, v. 93, p. 921 – 937, 1982.

RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. **J Biomed Mater Res.**, v. 34, n. 1, p. 21 – 28, 1997.

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 Vet Educ**, v. 13, n. 4, p. 198 – 204, 2001.

REDMAN, S. N.; OLDFIELD, S. F.; ARCHER, C. W. Current strategies for articular cartilage repair. **European Cells and Materials**, v. 9, p. 23 – 32, 2005.

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.

ROSSDALE, P. D.; HOPES, N. J.; DIGBY, K.; OFFORD, K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. **Veterinary Record**, v. 116, p. 66 – 69, 1985.

SAMPAIO, J. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de pesquisa e ensino em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SAMS, A. E.; NIXON, A.J. Chondrocyte-laden collagen scaffolds for resurfacing extensive articular cartilage defects. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 3, n.1, p. 47 – 59, 1995.

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

SECHRIEST, V. F.; MIAO, Y. J.; NIYIBIZI, C.; WESTERHAUSEN - LARSON, A.; MATTHEW, H. W.; EVANS, C. H.; FU, F. H.; SUH, J. K. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. **J Biomed Mater Res**, v. 49, n. 4, p. 534 – 541, 2000.

SHI, D. H.; CAI, D. Z.; ZHOU, C. R.; RONG, L. M.; WANG, K.; XU, Y. C. Development and potential of a biomimetic chitosan/type II collagen scaffold for cartilage tissue engineering. **Chin Med J.**, v. 118, n. 17, p. 1436 – 1443, 2005.

SIMARD, P.; GALARNEAU, H.; MAROIS, S.; RUSU, D.; HOEMANN, C. D.; POUBELLE, P.; EL - GABALAWY, H.; FERNANDES, M. J. G. Neutrophils exhibit distinct phenotypes toward chitosans with different degrees of deacetylation: implications for cartilage repair. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 1 -10, 2009.

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](http://www.elsevier.com/locate/RVSC)>. Acesso em: 28 jan. 2010.

STASHAK, T.S. **Adam's lameness in horses**. 5 ed. Philadelphia: Willians & Wilkins, 2002. 1174 p.

SUGIUCHI, H.; ANDO, Y.; MANABE, M.; NAKAMURA, E.; MIZUTA, H.; NAGATA, S.; OKABE, H. Measurement of total and differential white blood cell counts in synovial fluid by means of an automated hematology analyzer. **J Lab Clin Med.**, v. 146, n. 1, p. 36 – 42, 2005.

TAN, H.; CHU, C. R.; PAYNE, K. A.; MARRA, K. G. Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 2499 – 2506, 2009.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 306 - 312, 2005.

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 DEN BERG, W.B. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis: Review. **Arthritis Research**, v. 31, n.1, p. 18 - 26, 2001.

VAN DEN BOOM, R.; VAN DE LEST, C. H.; BULL, S.; BRAMA, R. A.; VAN WEEREN, P. R.; BARNEVELD, A. Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E2 and glycosaminoglycans in healthy equine joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p. 250 – 256, 2005.

VANDERPERREN, K.; RAES, E.; HOEGAERTS, M.; SAUNDERS, J. H. Diagnostic imaging of the equine tarsal region using radiography and ultrasonography. Part 1: The soft tissues. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 179 – 187, 2009.

WILKE, M. M.; NYDAM, D. V.; NIXON, A.J. Enhanced Early Chondrogenesis in Articular Defects following Arthroscopic Mesenchymal Stem Cell Implantation in an Equine Model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, p. 913 – 925, 2007.

WORSTER, A. A.; BROWER - TOLAND, B. D.; FORTIER, L. A.; BENT, S. J.; WILLIAMS, J.; NIXON, A. J. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor- β 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 19, p. 738 – 749, 2001.

YAMANE, S.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; FUNAKOSHI, T.; MASUKO, T.; HARADA, K.; MINAMI, A.; MONDE, K.; NISHIMURA, S. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 6, p. 611 – 619, 2005.

Apêndice A – Mediana da graduação da claudicação de membros pélvicos, de cinco cavalos, obtidos após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	1	7	14	21	30	60	90	120	150	180
1	2	4	4	2	2	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
3	2	5	2	2	2	2	1	1	1	1
4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
5	2	3	2	2	2	1	1	1	1	1
Mediana	2	3	2	2	2	1	1	1	1	1

Apêndice B - Mediana da graduação da claudicação de membros pélvicos, de cinco cavalos, obtidos após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	1	7	14	21	30	60	90	120	150	180
1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
3	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
5	2	3	2	2	2	1	1	1	1	1
Mediana	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1

Apêndice C – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da circunferência (cm linear) da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalos	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	29	34	35	36,5	35	34	33	33	33	33
2	30	31	32	34	32	31	30	30	31	30
3	30	35	35	35	36	35,5	33	34	32,5	32,5
4	28,5	33	30	31	35	33	31	31	31,5	32
5	28,5	33,5	33	33	33	31	30	30	32	31,5
Média	29,2	33,3	33	33,9	34,2	32,9	31,4	31,6	32	31,8
DP	0,75	1,48	2,12	2,07	1,64	1,94	1,51	1,81	0,79	1,15

Apêndice D – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da circunferência (cm linear) da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	29	31	32,5	31	32	31,5	32	31	31	32
2	28,5	29,5	31	29	29	30	30	30	29	29
3	30	33	31	33,5	34	33	32	33	32	32
4	30	34	35	34	33	31	30	30	32	32
5	29	36,5	35	35	35	33	31	31	31,5	32
Média	29,3	32,8	32,9	32,5	32,6	31,7	31	31	31,1	31,4
DP	0,67	2,70	2,01	2,44	2,30	1,30	1	1,22	1,24	1,34

Apêndice E – Medianas obtidas em diferentes momentos do escore de avaliação radiográfica da articulação tibiotársica, do cavalo 1, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Dias	Aumento de volume dos tecidos moles periarticulares	Mineralização de tecidos moles	Aumento do espaço articular	Diminuição do espaço articular	Evidencia de osteofitos	Evidencia de entesofitos	Esclerose do osso subcondral	Mudanças erosivas e lesões articulares	Evidencia de fragmentos osteocondrais	Mediana
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5
21	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5
30	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5
60	3	0	0	0	1	1	0	0	0	5
90	3	0	0	0	1	1	0	0	0	5
120	2	0	0	0	1	1	0	0	0	4
150	2	0	0	0	1	1	0	0	0	4
180	2	0	0	0	1	1	0	0	0	4

[illegible]

Apêndice K – Medianas obtidas em diferentes momentos do escore de avaliação radiográfica da articulação tibiotársica, do cavalo 4, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

[illegible]

Apêndice M – Medianas obtidas em diferentes momentos do escore de avaliação radiográfica da articulação tibiotársica, do cavalo 5, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Dias	Aumento de volume dos tecidos moles periarticulares	Mineralização de tecidos moles	Aumento do espaço articular	Diminuição do espaço articular	Evidencia de osteofitos	Evidencia de entesofitos	Esclerose do osso subcondral	Mudanças erosivas e lesões articulares	Evidencia de fragmentos osteocondrais	Mediana
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3
7	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4
15	3	0	0	0	1	0	0	0	0	4
21	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
30	2	0	0	0	1	0	0	0	0	3
60	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
90	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
120	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
150	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
180	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Apêndice N – Medianas obtidas em diferentes momentos do escore de avaliação radiográfica da articulação tibiotársica, do cavalo 5, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Dias	Aumento de volume dos tecidos moles periarticulares	Mineralização de tecidos moles	Aumento do espaço articular	Diminuição do espaço articular	Evidencia de osteofitos	Evidencia de entesofitos	Esclerose do osso subcondral	Mudanças erosivas e lesões articulares	Evidencia de fragmentos osteocondrais	Mediana
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4
7	4	0	0	0	1	0	0	0	0	5
15	4	0	0	0	1	0	0	0	0	5
21	3	0	0	0	1	0	0	0	0	4
30	3	0	0	0	1	0	0	0	0	4
60	2	0	0	0	1	0	0	0	0	3
90	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
180	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Apêndice O – Medianas obtidas em diferentes momentos do escore de avaliação radiográfica da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)										
	0	2	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	0	3	3	8	8	8	8	8	6	6	6
2	0	3	6	6	6	5	4	4	4	3	3
3	0	4	6	6	6	6	6	7	6	4	4
4	0	3	4	5	4	4	5	5	2	2	1
5	0	6	7	7	5	6	5	4	3	3	3
Mediana	0	3	6	6	6	6	5	5	4	3	3

Apêndice P – Medianas obtidas em diferentes momentos do escore de avaliação radiográfica da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)										
	0	2	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	0	3	3	6	6	6	6	5	5	4	4
2	0	3	6	6	5	5	4	3	3	3	3
3	0	4	4	4	4	4	4	3	1	1	1
4	0	3	6	6	6	5	4	4	2	2	2
5	0	7	8	8	7	7	6	4	2	2	2
Mediana	0	3	6	6	6	5	4	4	2	2	2

Apêndice Q - Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) do defeito osteocondral da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame radiográfico após realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	1	7	14	21	30	60	90	120	150	180
1	0,43	0,66	0,52	0,66	0,58	0,45	0,4	0,29	0,3	0,36
2	0,38	0,4	0,45	0,32	0,29	0,28	0,27	0,23	0,36	0,32
3	0,47	0,25	0,59	0,46	0,36	0,25	0,18	0,3	0,36	0,27
4	0,38	0,34	0,35	0,31	0,3	0,22	0,28	0,22	0,29	0,2
5	0,56	0,51	0,43	0,48	0,37	0,28	0,32	0,29	0,29	0,16
Média	0,44	0,43	0,46	0,44	0,38	0,29	0,29	0,26	0,32	0,26
DP	0,07	0,15	0,09	0,14	0,11	0,08	0,08	0,03	0,03	0,08

Apêndice R - Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) do defeito osteocondral da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame radiográfico após realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	1	7	14	21	30	60	90	120	150	180
1	0,65	0,67	0,68	0,66	0,41	0,4	0,25	0,3	0,32	0,15
2	0,69	0,52	0,54	0,31	0,59	0,5	0,27	0,2	0,28	0,25
3	0,49	0,62	0,56	0,48	0,46	0,36	0,33	0,24	0,17	0,17
4	0,57	0,46	0,51	0,42	0,54	0,42	0,37	0,29	0,3	0,37
5	0,53	0,4	0,5	0,45	0,22	0,42	0,22	0,19	0,26	0,18
Média	0,58	0,53	0,55	0,46	0,44	0,42	0,28	0,24	0,26	0,22
DP	0,08	0,11	0,07	0,12	0,14	0,05	0,06	0,05	0,05	0,08

Apêndice S – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área total (cm^2) do recesso medial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)							
	0	1	7	14	21	60	120	180
1	1,83	1,99	2,86	2,88	2,88	3,23	3,2	2,1
2	3,43	2,77	2,5	3,1	3,46	3,69	3,93	1,1
3	1,91	4,05	3,46	3,09	3,23	4,55	3,66	4,32
4	2,2	2,5	4,08	3,64	3,17	4,06	3,1	2,36
5	2,44	2,38	2,12	2,55	3,32	3,52	2,63	2,08
MÉDIA	2,36	2,73	3,0	3,05	3,21	3,81	3,30	2,39
DP	0,64	0,78	0,77	0,39	0,21	0,51	0,50	1,18

Apêndice T – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área total (cm^2) do recesso medial da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)							
	0	1	7	14	21	60	120	180
1	2,18	3,5	2,24	2,15	2,88	3,28	2,81	2
2	1,98	3,95	3,09	2,69	3,02	2,8	3,01	1,22
3	2,94	3,9	3,59	4,72	5,01	4,87	3,98	4,31
4	2,28	2,93	2,78	4,07	5,21	3,55	2,87	2,14
5	1,28	1,86	2,57	3,41	3,66	5,38	2,88	2,15
MÉDIA	2,13	3,22	2,85	3,40	3,95	3,97	3,11	2,36
DP	0,59	0,86	0,51	1,03	1,09	1,09	0,49	1,15

Apêndice U – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) com conteúdo anecóico do recesso medial da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)							
	0	1	7	14	21	60	120	180
1	0,99	0,23	0,44	1,97	0,15	0,52	0,7	1,44
2	1,74	0,86	0,15	0	0,27	0,24	0,28	0,69
3	1,14	0,22	1,3	0,75	0,6	0,88	1,82	0,74
4	1,17	1,09	0,92	1,25	0,97	0,36	1,35	0,28
5	1,54	1,82	0,22	0,11	0,34	0,73	0,82	0,53
MÉDIA	1,31	0,84	0,60	0,81	0,46	0,54	0,99	0,56
DP	0,31	0,66	0,49	0,81	0,32	0,26	0,59	0,20

Apêndice V – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) com conteúdo anecóico do recesso medial, da articulação tibiotarsica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)							
	0	1	7	14	21	60	120	180
1	1,24	1,15	0,91	1,02	0,75	0,96	0,84	1,83
2	1,42	1,44	1,09	1,82	1,38	1,04	3,01	0,76
3	1,88	1,42	2,16	1,84	1,64	0,76	2,5	1,08
4	1,55	1,71	0,12	1,54	0,18	0,32	0,44	0,49
5	0,34	0,81	0,33	0,55	0,12	0	0,23	0,46
MÉDIA	1,28	1,30	0,92	1,35	0,81	0,61	1,40	0,69
DP	0,57	0,34	0,79	0,55	0,68	0,44	1,26	0,28

Apêndice W – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)							
	0	1	7	14	21	60	120	180
1	0	0,57	0,32	0,32	0,57	0,46	0,23	0,31
2	0	0,37	0,42	0,44	0,48	0,28	0,36	0,11
3	0	0,74	0,64	0,46	0,64	0,44	0,31	0,24
4	0	0,36	0,34	0,36	0,36	0,14	0,15	0,14
5	0	0,57	0,57	0,57	0,4	0,29	0,17	0,1
MÉDIA	0	0,52	0,45	0,43	0,49	0,32	0,24	0,18
DP	0	0,15	0,14	0,09	0,11	0,13	0,08	0,09

Apêndice X – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção longitudinal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)							
	0	1	7	14	21	60	120	180
1	0	0,55	0,43	0,43	0,42	0,48	0,26	0,33
2	0	0,2	0,58	0,48	0,38	0,39	0,09	0,03
3	0	0,29	0,39	0,49	0,4	0,38	0,28	0,2
4	0	0,95	0,95	0,63	0,58	0,55	0,31	0,4
5	0	0,32	0,32	0,33	0,27	0,27	0,24	0,12
MÉDIA	0	0,46	0,53	0,47	0,41	0,41	0,23	0,21
DP	0	0,30	0,25	0,10	0,11	0,10	0,08	0,15

Apêndice Z – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção transversal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)							
	0	1	7	14	21	60	120	180
1	0	0,37	0,45	0,45	0,49	0,35	0,26	0,2
2	0	0,33	0,33	0,3	0,27	0,21	0,24	0,54
3	0	0,48	0,48	0,61	0,44	0,34	0,12	0,28
4	0	0,35	0,29	0,41	0,33	0,19	0,1	0,1
5	0	0,7	0,91	0,59	0,48	0,56	0,14	0,04
MÉDIA	0	0,44	0,49	0,47	0,40	0,33	0,17	0,23
DP	0	0,15	0,24	0,12	0,09	0,14	0,07	0,19

Apêndice AA – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da área (cm^2) do defeito osteocondral na articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos através de exame ultrassonográfico (secção transversal) antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)							
	0	1	7	14	21	60	120	180
1	0	0,3	0,3	0,25	0,24	0,26	0,19	0,25
2	0	0,8	0,83	0,6	0,48	0,26	0,09	0,08
3	0	0,54	0,54	0,54	0,55	0,5	0,32	0,15
4	0	0,5	0,5	0,44	0,41	0,41	0,13	0,33
5	0	0,45	0,45	0,3	0,32	0,19	0,11	0,08
MÉDIA	0	0,51	0,52	0,42	0,4	0,32	0,16	0,17
DP	0	0,18	0,19	0,15	0,12	0,12	0,09	0,10

Apêndice BB – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de proteína plasmática total, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* - São Paulo - 2009.

Cavalos	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	7,4	7,2	7,4	7,4	7,4	7	7,2	6,6	6,6	6,7
2	6,8	6,6	6,8	6,9	7	7,2	7,2	6,4	6,7	6,5
3	7,4	7,4	7,8	8	7,8	7,4	7,4	6,8	7,2	7
4	7	7	7,2	7	7	6,6	6,8	6,4	6,6	6,8
5	6,6	7,4	7	7	7	6,6	6,6	6,6	6,3	6,4
Média	7,04 ^{ac}	7,12 ^{ac}	7,24 ^a	7,26 ^a	7,24 ^a	6,96 ^{abc}	7,04 ^{ac}	6,56 ^b	6,68 ^{bc}	6,68 ^{bc}
DP	0,35	0,33	0,38	0,45	0,35	0,35	0,32	0,16	0,32	0,23

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Apêndice CC – Resultados obtidos em diferentes momentos do aspecto do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	1	1	3	CI	2	1	1	3	1	1
2	1	1	3	CI	1	CI	3	3	1	1
3	1	3	1	2	1	3	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	CI	3	3
5	1	3	1	3	3	1	3	CI	1	2
Mediana	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1

Legenda: CI – colheita improdutiva

Escores: 1 (límpido); 2 (semi-turvo); 3 (turvo)

Apêndice DD – Resultados obtidos em diferentes momentos do aspecto do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	3	1	1	2	2	1	1	1
3	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1
4	1	1	3	3	1	CI	1	1	3	2
5	1	3	3	3	1	1	3	CI	3	3
Mediana	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1

Legenda: CI – colheita improdutiva

Escore: 1 (límpido); 2 (semi-turvo); 3 (turvo)

Apêndice EE – Resultados obtidos em diferentes momentos da análise da coloração do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	1	3	2	CI	3	1	3	3	3	1
2	1	3	3	CI	1	CI	3	3	1	1
3	1	2	1	3	1	3	2	3	1	3
4	1	1	1	1	1	1	3	CI	1	1
5	1	2	1	1	3	1	2	CI	1	3
Mediana	1	2	1	1	1	1	3	3	1	1

Legenda: CI – colheita improdutiva

Escore: 1 (amarelo claro); 2 (amarelo ouro); 3 (avermelhado)

Apêndice FF – Resultados obtidos em diferentes momentos da análise da coloração do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	1	2	2	1	2	1	3	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1
3	1	1	2	2	1	1	1	1	3	1
4	1	1	2	3	1	CI	1	1	3	2
5	3	1	2	1	1	1	3	CI	1	3
Mediana	1	1	2	1	1	1	3	1	1	1

Legenda: CI – colheita improdutiva

Escore: 1 (amarelo claro); 2 (amarelo ouro); 3 (avermelhado)

Apêndice GG – Medianas do grau de viscosidade do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	2	0	0	CI	1	1	2	1	1	1
2	1	0	0	CI	0	CI	0	0	1	1
3	1	0	0	0	1	1	1	1	1	2
4	2	1	1	1	2	0	1	CI	1	2
5	0	0	1	1	1	0	1	CI	1	2
Mediana	1	0	0	1	1	0,5	1	1	1	2

Legenda: CI – colheita improdutiva

Graduação da viscosidade: boa (2 – fio com tamanho de 2,5 a 5 cm); regular (1- fio com tamanho menor que 2,5 cm); e ruim (0 - não há formação de fio).

Apêndice HH – Medianas do grau de viscosidade do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	2	0	0	2	0	1	2	1	1	2
2	2	0	0	1	2	1	1	1	1	2
3	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2
4	2	0	0	2	2	CI	2	2	0	2
5	0	0	0	1	1	1	1	CI	1	2
Mediana	2	0	0	2	1	1	2	1,5	1	2

Legenda: CI – colheita improdutiva

Graduação da viscosidade: boa (2 – fio com tamanho de 2,5 a 5 cm); regular (1- fio com tamanho menor que 2,5 cm); e ruim (0 - não há formação de fio).

Apêndice II – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da contagem global de células (células/ μ l) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	10	1350	2820	CI	1550	60	140	VI	10	160
2	40	360	30	CI	180	CI	180	VI	10	20
3	110	141	1900	700	140	50	40	20	VI	40
4	60	20	330	100	100	40	180	CI	10	20
5	140	100	100	20	140	50	VI	CI	30	0
Média	72	394,2	1036	273,33	422	50	135	20	15	48
DP	52,63	548,95	1256,55	371,66	631,20	8,16	66,08	-----	10	64,18

Legenda: VI – volume insuficiente; CI – colheita improdutiva

Apêndice JJ – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) da contagem global de células (células/ μ l) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	10	130	180	340	100	110	160	110	30	170
2	60	140	40	80	70	30	VI	190	30	20
3	180	150	1260	260	430	80	60	20	VI	60
4	110	80	2850	1300	220	CI	VI	VI	VI	20
5	170	640	310	200	210	140	VI	CI	VI	30
Média	106	228	928	436	206	90	110	106,66	30	60
DP	72,31	231,88	1176,25	492,21	141,52	46,90	70,71	85,04	0	63,63

Legenda: VI – volume insuficiente; CI – colheita improdutiva.

Apêndice KK – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de fibrinogênio plasmático, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)								
	0	2	7	15	21	30	35	42	49
1	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4
2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4
3	0,4	0,4	0,6	0,4	0,4	0,6	0,2	0,6	0,4
4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2
5	0,4	0,6	0,6	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2
Média	0,28 ^a	0,4 ^a	0,44 ^a	0,36 ^a	0,4 ^a	0,36 ^a	0,28 ^a	0,32 ^a	0,32 ^a
DP	0,10	0,14	0,16	0,08	0	0,16	0,10	0,17	0,10

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Apêndice LL – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de proteína do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	1,55	4,97	4,82	CI	3,36	1,53	0,37	VI	0,74	0,63
2	1,21	4,40	VI	CI	1,71	CI	VI	VI	0,12	0,62
3	0,82	4,82	4,74	3,33	3,04	1,2	4,39	0,88	VI	1,18
4	1,62	2,01	2,00	1,67	1,00	NPL	NPL	CI	0,89	0,85
5	0,96	3,45	2,81	2,06	1,73	1,47	VI	CI	VI	1,12
Média	1,23	3,93	3,59	2,35	2,17	1,40	2,38	0,88	0,58	0,88
DP	0,35	1,22	1,40	0,86	0,99	0,17	2,84	-----	0,40	0,26

Legenda: VI – volume insuficiente; CI – colheita improdutiva; NPL – não foi possível leitura

Apêndice MM – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de proteína do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	15	21	30	60	90	120	150	180
1	1,77	2,06	2,93	1,76	3	0,84	0,91	0,68	0,62	0,79
2	1,02	1,59	1,28	0,92	1,17	1,16	0,90	0,83	0,63	0,78
3	0,94	NPL	3,34	3,7	3,24	1,18	0,84	0,42	VI	1,09
4	1,55	3,28	3,12	2,96	1,60	CI	VI	VI	VI	1,1
5	1,42	4,26	3,08	2,71	1,78	1,58	VI	CI	VI	1,2
Média	1,34	2,80	2,75	2,41	2,16	1,19	0,88	0,64	0,62	0,99
DP	0,35	1,20	0,83	1,08	0,91	0,30	0,03	0,20	0,0	0,19

Legenda: VI – volume insuficiente; CI – colheita improdutiva

Apêndice NN – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de ácido hialurônico (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	14	21	30	60	90	120	150	180
1	608,51	379,19	440,56	-	539,95	622,50	511,68	480,80	645,22	549,79
2	379,49	223,80	176,08	-	162,05	-	911,75	937,89	631,62	790,38
3	431,25	220,91	-	448,20	404,52	548,30	637,11	561,57	393,40	719,36
4	566,22	369,33	251,85	365,34	417,86	365,27	597,21	524,62	635,83	649,72
5	508,19	257,22	314,42	297,99	267,57	613,14	407,36	540,70	350,65	517,24
MÉDIA	498,73	290,09	295,73	370,51	358,39	537,30	613,02	609,11	531,34	645,30
DP	94,16	78,23	111,91	75,24	146,14	119,34	188,83	186,17	146,30	114,10

Apêndice OO – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de ácido hialurônico (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	14	21	30	60	90	120	150	180
1	449,27	193,01	259,68	195,65	293,18	419,99	311,69	415,17	485,89	710,40
2	292,09	244,20	270,57	320,09	401,77	586,76	759,20	458,22	621,89	455,79
3	662,23	230,61	400,01	455,78	453,56	161,63	264,82	675,02	762,17	800,68
4	644,78	214,12	435,57	474,08	442,38	68,93	993,47	850,29	928,92	875,83
5	636,41	189,04	259,57	227,69	127,30	274,72	387,78	343,04	383,66	591,72
MÉDIA	536,96	214,19	325,08	334,66	343,64	302,41	543,39	548,35	636,51	686,88
DP	161,91	23,72	85,68	127,56	136,53	206,02	318,06	209,30	216,87	167,08

Apêndice PP – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de condroitin sulfato (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (tratado) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	14	21	30	60	90	120	150	180
1	27,56	83,20	46,88	-	42,03	44,51	48,00	40,69	62,00	70,95
2	9,64	41,68	23,34	-	25,26	-	59,78	56,13	63,14	69,14
3	25,81	70,36	-	95,17	55,46	19,47	36,53	47,02	41,91	21,00
4	19,67	28,56	29,74	35,19	26,61	24,40	30,24	34,15	46,01	36,61
5	24,15	50,95	61,45	69,91	64,30	50,55	63,95	65,76	75,83	68,19
MÉDIA	21,36	54,95	40,35	66,75	42,73	34,73	47,70	48,75	57,78	53,18
DP	7,18	21,93	17,22	30,11	17,27	15,12	14,49	12,50	13,81	22,94

Apêndice QQ – Valores médios e Desvio Padrão ($\pm$ DP) dos níveis de condroitin sulfato (ug/ml) do líquido sinovial da articulação tibiotársica, de cinco cavalos, obtidos antes e após artroscopia para realização de defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do *talus* (controle) - São Paulo - 2009.

Cavalo	Período de avaliação (dias)									
	0	7	14	21	30	60	90	120	150	180
1	21,58	39,59	38,04	36,49	35,94	36,89	42,54	42,26	62,99	75,80
2	23,46	39,72	38,11	16,96	33,48	30,93	28,91	32,00	22,91	24,64
3	35,87	34,76	74,26	60,39	60,27	16,34	23,59	75,41	71,76	75,84
4	21,13	31,25	37,63	61,29	37,60	2,13	44,90	57,45	40,64	35,64
5	36,83	67,83	73,15	74,08	51,37	30,18	29,76	28,62	34,84	36,61
MÉDIA	27,77	42,63	52,24	49,84	43,73	23,29	33,94	47,15	46,63	49,71
DP	7,89	14,52	19,60	22,85	11,57	14,03	9,27	19,37	20,23	24,30