Anderson Coutinho da Silva

**Estudo da osteoartrose em joelhos de cães secundária à
ruptura do ligamento cruzado cranial**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciência.

Área de concentração: Reumatologia

Orientador: Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Anderson Coutinho da

Estudo da osteoartrose em joelhos de cães secundária à ruptura do ligamento cruzado cranial / Anderson Coutinho da Silva. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Reumatologia.

Orientador: Natalino Hajime Yoshinari.

Descritores: 1.Osteoartrite/patologia 2.Líquido sinovial 3.Citocinas 4.Quimiocinas
5.Cartilagem articular/patologia 6.Cartilagem articular/metabolismo 7.Ligamentos
articulares/cirurgia 8.Joelho 9.Cães

USP/FM/SBD-011/09

“Podemos acreditar que tudo que a vida nos oferecerá no futuro é repetir o que fizemos ontem e hoje. Mas, se prestarmos atenção, vamos nos dar conta de que nenhum dia é igual a outro. Cada manhã traz uma benção escondida; uma benção que só serve para esse dia e que não se pode guardar nem desaproveitar.

Se não usamos este milagre hoje, ele vai se perder.

Este milagre está nos detalhes do cotidiano; é preciso viver cada minuto porque ali encontramos a saída de nossas confusões, a alegria de nossos bons momentos, a pista correta para a decisão que tomaremos.

Nunca podemos deixar que cada dia pareça igual ao anterior porque todos os dias são diferentes, porque estamos em constante processo de mudança.”

Paulo Coelho

*À Deus, por se fazer presente em
todos os momentos de minha vida.*

*À minha querida esposa Fernanda,
que Deus colocou no meu caminho e
abrilhantou a minha vida, me dando
força, carinho e muito amor.*

*Agradeço aos meus pais, Maria Adelina
Coutinho da Silva e Severino Lopes da Silva,
que são verdadeiros exemplos de perseverança.
Pessoas lutadoras, incansáveis e vencedoras.*

*Aos animais, que são obra divina e
merecem sempre serem respeitados e
amados.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari, meu orientador e exemplo de profissional dedicado e competente. Agradeço pela confiança depositada no desenvolvimento deste trabalho, assim como pelas lições de amizade, paciência e profissionalismo.

À Profa. Dra. Walcy Rosália Teodoro, pelo exemplo de seriedade e dedicação no desenvolvimento deste e de diversos trabalhos, sempre com competência e sorrisos, acolhendo a todos com o grande coração de mãe. Obrigado.

À Profa. Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello, do Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação da Disciplina de Reumatologia, foram poucos os momentos, mas importantes para o meu amadurecimento, assim como pelas importantes sugestões, análises laboratoriais e revisão do texto para publicação.

À Dra. Ana Paula Pereira Velosa, pelas importantes sugestões e revisão deste trabalho.

Ao Dr. Edwin Roger, cujo auxílio na manipulação dos dados estatístico foi de suma importância para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Eloisa Bonfá pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho dentro da Disciplina de Reumatologia da FMUSP.

Aos amigos e funcionário presentes á época do desenvolvimento deste trabalho no LIM-17, Virgínia, Mariana, Elenice, Maira, Guilherme Anselmo, Cleonice, dentre outros.

À Aurora e Fátima, do Laboratório de fisiopatologia da Inflamação da Disciplina de Reumatologia, sempre muito gentis e dedicadas, vocês foram importantes na realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Nilton Abreu Zanco, um amigo sempre presente, e o principal incentivador do meu ingresso como cirurgião do HOVET-Metodista.

Aos funcionários da Universidade Metodista do Curso de Medicina Veterinária que sempre estão presentes, Prof. Milton Kolber, Profa. Tania Parra, Prof. Paulo Salzo, Dra. Regina, Dra. Tatiane, Dr. Celso, Dr. Henrique, André Ferreira, Silvana,

Álmira, Ílma, Adriána, todos os médicos Veterinários voluntários, dentre outros profissionais...

Aos meus amigos Thíago C. Prada e Henrique Biágio, pelas prestações de serviços como auxiliar nos procedimentos cirúrgicos e acompanhamentos dos animais operados, e em tantas outras horas de dificuldades.

A todos que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho, que Deus abençoe e ilumine a todos.

À FAPESP, pela ajuda financeira.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertação, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO E JUSTIFICATIVA.....	6
3	MÉTODOS.....	8
3.1	Seleção dos animais.....	8
3.2	Critérios de inclusão.....	9
3.3	Critérios de exclusão.....	10
3.4	Avaliação macroscópica.....	11
3.5	Coleta de materiais.....	11
3.6	Estudo morfológico.....	12
3.6.1	Morfometria.....	13
3.6.2	Avaliação do grau de lesão articular e proteoglicanas na cartilagem.....	14
3.7	Avaliação radiográfica.....	15
3.8	Análise do líquido sinovial.....	17
3.8.1	Análise físico-química.....	17
3.8.2	Análise da celularidade.....	18
3.8.3	Dosagens de citocinas de IL- 6; IL- 10 e TNF- α e da quimiocina CCL2/MCP-1 (proteína quimioatraente de macrófagos) pelo método de Elisa.....	19
3.9	Análise estatística.....	19
4	RESULTADOS	22
4.1	Avaliação demográfica, clínica e radiológica.....	22
4.2	Análise morfológica da cartilagem articular.....	29
4.3	Análise morfométrica.....	35

4.4	Análise do líquido sinovial.....	39
4.5	Dosagem de Citocinas (il-6, il-10, TNF- α) e da Quimiocina CCL2/MCP-1.....	45
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONCLUSÕES.....	56
7	ANEXOS.....	58
8	REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figuras 1a e 1b - Exame físico articular para o diagnóstico da (RLCCr) com o animal em decúbito lateral. Em 1a, teste do movimento de gaveta com o posicionamento das mãos sobre a tíbia e o fêmur, ficando os côndilos femorais seguros e desliza-se o platô tibial para cranial. Em 1b, o teste de compressão tibial realizando a flexão da articulação do tarso, e a tíbia desloca-se cranialmente devido à origem e inserção do tendão do músculo gastrocnêmio.....	10
Figura 2 - Comparação da intensidade de claudicação e comprometimento radiológico entre os grupos de cães com diferentes tempos de RLCCr.....	26
Figura 3 - Diferentes graus de OA ao estudo radiológico dos cães operados com RLCCr, de acordo com critério de Rendano Jr e Shoup (1985).	27
Figura 4 - Cortes <i>histológicos de cartilagem articular dos animais dos grupos normais, os tecidos foram corados com H&E, Picrosírius e Safranina-O / fast-green. Em A, observamos superfície articular homogênea e pequena desorganização condrocitária (seta). Em D, está demonstrado irregularidades na superfície articular (seta grossa) e desorganização celular (seta fina). Em B, notar em vermelho a integridade da rede de fibras colágenas (seta) em E, alterações na rede de colágeno, com formação de fibras grossas (seta). Em C, integridade da matriz cartilaginosa (proteoglicanas), demonstrado pela coloração avermelhada da cartilagem (seta). Em F, notar em azul a perda de proteoglicanas, com predomínio na região superficial da cartilagem (seta). Notar a diferença do grupo com osteoartrite em relação ao grupo normal (Aumento: 200X).....</i>	32
FIGURA 5 - Cortes <i>histológicos de cartilagem articular dos animais operados com RLCCr, os tecidos foram corados com H&E, Picrosírius e Safranina-O / fast-green. Em A, observamos irregularidades na superfície, diminuição de condrócitos, com presença de clusters de condrócitos (seta). Em D, está demonstrado formação fibrocartilaginosa na superfície articular (seta). Em B e E, alterações na rede de colágeno (seta), notar em E, mudanças na birrefringência (seta preta) e presença de fibras grossas e irregulares (seta branca). Em C e F, notar em azul a perda de proteoglicanas e em F, o predomínio desta coloração na formação fibrocartilaginosa. Nota-se a evolução do processo degenerativo da</i>	

<i>cartilagem do grupo RCCr>20 dias em relação ao grupo RCCr<20 dias (Aumento: 200X).....</i>	34
Figura 6 – Avaliação morfométrica do tecido cartilaginoso em diferentes colorações nos grupos de cães operados RLCCr < 20 dias e RLCCr >20 dias, e nos grupos controle com OA e cartilagem normal (CN).....	36
Figura 7 – Análise semi-quantitativa da perda de proteoglicanos nos grupos de cães operados RLCCr < 20 dias e RLCCr > 20 dias, e nos animais dos grupos controle com OA e cartilagem normal (CN).....	37
Figura 8 – Análise das propriedades físico-químicas do líquido sinovial dos animais operados com RLCCr e Controle normal (NL).....	43
Figura 9A e 9B - Análise da celularidade do Líquido sinovial dos animais operados com RLCCr e Controle normal (NL).....	44
Figura 10 – Expressão da quimiocina CCL2/MCP-1 e das Citocinas IL-6; IL-10 e TNF- α nos animais operados de RLCCr e cães do grupo controle normal (NL).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1A. Avaliação dos cães com RLCCr operados antes de 20 dias.....	23
Tabela 1B. Avaliação do tipo da RLCCr, grau radiológico e classificação macroscópica da lesão na cartilagem articular dos cães operados antes de 20 dias da lesão.....	23
Tabela 2A. Avaliação clínica e exame físico articular do grupo de cães com RLCCr operados após 20 dias da lesão.....	24
Tabela 2B - Avaliação do tipo de RLCCr, grau radiológico e classificação macroscópica de lesão na cartilagem articular dos cães operados após 20 dias da lesão	25
Tabela 3A. Grupo controle com osteoartrite.....	28
Tabela 3B. Grupo controle sem osteoartrite.....	28
Tabela 4 - Ocorrência dos casos estudados através do método semi-quantitativo para o escore histológico do tecido cartilaginoso na coloração de Safranina O/fast green.	38
Tabela 5. Estudo da viscosidade, teste do coágulo de mucina, dosagem protéica e mensuração do pH no líquido sinovial dos cães com RLCCr operados antes de 20 dias da lesão.....	40
Tabela 6. Estudo da viscosidade, teste do coágulo de mucina, dosagem protéica e mensuração do pH no líquido sinovial dos cães com RLCCr operados após 20 dias da lesão.....	41
Tabela 7. Estudo da viscosidade, teste do coágulo de mucina, dosagem protéica e mensuração do pH no líquido sinovial dos cães do grupo controle sem osteoartrite.....	41
Tabela 8 – (ANEXO)- Quantificação de condrócitos (H&E) e colágeno (Picrosírius) na cartilagem articular de animais com RLCCr operados antes de 20 dias de lesão.....	58

Tabela 9 - (ANEXO) - Quantificação de condrócitos (H&E) e colágeno (Picrosírius) na cartilagem articular de animais com RLCCr operados após 20 dias de lesão.....	59
Tabela 10 - (ANEXO). - Quantificação de condrócitos (H&E) e colágeno (Picrosírius) na cartilagem articular dos animais do grupo controle com osteoartrite.....	60
Tabela 11 - (ANEXO). - Quantificação de condrócitos (H&E) e colágeno (Picrosírius) na cartilagem articular dos animais do grupo controle sem osteoartrite.....	60
Tabela 12 - (ANEXO). - Celularidade do fluido sinovial do grupo de animais com RLCCr operados antes de 20 dias da lesão.....	61
Tabela 13 - (ANEXO). - Celularidade do fluido sinovial do grupo de animais com RLCCr e operados após 20 dias da lesão.....	62
Tabela 14. - (ANEXO). - Celularidade do fluido sinovial de cães do grupo controle sem osteoartrite.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estadiamento Radiográfico do joelho Canino com OA	16
Quadro 2: Parâmetros de avaliação do líquido sinovial.....	17
Quadro 3 - Escore semiquantitativo compreendidos em graus de 0 a 6, para análise das cartilagens coradas com Safranina-O/ <i>fast-green</i> , que serviu para o estudo dos grupos operados com RLCCr, grupo normal de cartilagem e grupo com OA.....	64

RESUMO

Coutinho AS. *Estudo da osteoartrose em joelhos de cães secundária à ruptura do ligamento cruzado cranial*. Dissertação [Mestrado] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 84p.

INTRODUÇÃO e OBJETIVO: A osteoartrite (OA) embora frequente tem patogênese incerta em humanos. Descrevemos modelo experimental original de OA em cães, analisando em dois tempos diferentes as consequências da Ruptura Espontânea do Ligamento Cruzado Cranial (RLCCr). **MÉTODOS:** Vinte animais machos com menos de 5 anos (20 a 45 Kg) com RLCCr submetidos à artrotomia para estabilização articular tiveram fragmentos articulares removidos para análise. O grupo RLCCr < 20 (10 animais) foi operado antes dos vinte dias e o grupo > 20 (10 animais) após 20 dias do início da lesão. Sete animais com OA pré-existente (OA) que morreram por quaisquer motivos e 7 animais normais (NC) provenientes do C.C.Z., serviram de grupos controles. Os animais foram avaliados clínica e radiologicamente. Foi colhido líquido sinovial dos animais operados e de outros 20 cães controles submetidos às cirurgias por diferentes causas. Para estudo morfológico, os fragmentos de cartilagens foram corados com H&E e Picrosirius. A gravidade do escore histológico da OA foi quantificada através da coloração com Safranina O. Analisou-se citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF-alfa) e a quimiocina CCL2/MCP-1 nos líquidos sinoviais. **RESULTADOS:** Todos os cães tinham o teste de movimento da gaveta e exame de compressão da mesa tibial positivos. Achados radiográficos correlacionaram-se com maior tempo de RLCCr. Cartilagem articular de animais normais (NC) exibiram superfície preservada, disposição ordenada dos condrócitos e integridade da rede de colágeno. Exames histológicos em animais do grupo RLCCr < 20 mostraram irregularidades na superfície articular, diminuição no número de condrócitos e remodelamento de fibras de colágeno. No grupo > 20, observou-se osteófitos e irregularidades evidentes nas superfícies articulares. A gravidade do escore de acometimento histológico traduziu-se por intensa diminuição celular na superfície articular, com presença de “clusters” de condrócitos na região intermediária da cartilagem e total desorganização da rede de fibras de colágeno. A quimiocina CCL2/MCP-1 esteve aumentada no grupo com menos de 20 dias de lesão, enquanto a IL-6 foi mais expressiva nos animais operados tardiamente. **CONCLUSÃO:** O modelo experimental espontâneo de OA canino, estudado em dois tempos, é um instrumento original e útil para estudo da patogênese da osteoartrite, além de ter o mérito de preservar a integridade física dos animais de laboratório.

Descritores: 1.Osteoartrite/patologia 2.Líquido sinovial 3.Citocinas
4.Quimiocinas 5.Cartilagem articular/patologia 6.Cartilagem
articular/metabolismo 7.Ligamentos articulares/cirurgia 8.Joelho 9.Cães

SUMMARY

Coutinho AS. *Study of the osteoarthritis in knees of dogs secondary to cranial cruciate ligament rupture in dogs*. Dissertação [Mestrado]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2009. 84p.

INTRODUCTION and OBJECTIVE: Osteoarthritis (OA) is a frequent and severe rheumatic disease of unknown pathogenesis. We described an original experimental model of OA, analyzing the consequences of spontaneous cranial cruciate ligament rupture (*RLCCr*), occurred at two different times. **METHOD:** Twenty male animals, younger than 5 years old (20 to 45kg) with *RLCCr* were submitted to arthrotomy for articular stability and had cartilage fragments removed for analysis. The *Group RLCCR < 20* (10 animals) was operated before 20 days and *Group RLCCR > 20* (10 animals) after 20 days of beginning of lesion. Seven animals with pre-existent OA which died without any reason, and 7 normal animals (NC) from Service of Zoonosis Control were the control groups. The animals were submitted to clinical and radiological evaluations. Synovial fluid were collected from operated dogs and from another 20 control animals, submitted for surgical procedures for any reason. For the morphological study, the cartilage fragments were stained with H&E and Picrossirus. The score for OA severity was quantified using Safranin-O staining. Inflammatory cytokines (IL-6 and TNF alfa) and chemokine CCL2/MCP-1 were measured in sinovial fluid. **RESULTS:** At physical examination, all the dogs had positive drawer and the tibial plateau compression tests. Knee Radiographic data showed that narrowing of joint space, osteophytes and erosions were more prominent in *Group RLCCr > 20* animals. Articular cartilage of normal animals (NC) revealed preserved cartilage surface, organized disposition of chondrocytes and integrity of collagen net. Histological exams done in animals from *Group RLCCr > 20* showed irregularities on articular surface, reduction of the number of chondrocytes and collagen fibers remodeling. Animals from *Group RLCCR > 20* exhibited deep fibrillations, presence of chondrocytes clusters at intermediate area of cartilage, osteophytes and total disorganization of the collagen fibers net. Chemokine CCL2/MCP-1 was found overexpressed in dogs operated less than 20 days, while IL-6 was increased in late surgical group. **CONCLUSION:** The spontaneous model of canine *RLCCr*, studied at two distinct times, is an original and useful tool to understand pathogenesis of OA. Furthermore, the procedure preserves the animal integrity, becoming an Ethical laboratorial procedure.

Key words: 1. Osteoarthritis/pathology 2. Synovial fluid 3. Cytokines 4. Chemokine 5. Articular cartilage/pathology 6. Articular cartilage/metabolism 7. Ligaments to articulate/ surgery 8. Knee 9. Dogs

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite ou artrose (OA) é um processo degenerativo articular que acomete as articulações diartrodiais, de evolução lenta, grande relevância clínica, importante morbidade e responsável por enormes danos econômicos e sociais aos pacientes¹.

A degeneração articular é freqüentemente observada em humanos a partir da 4ª década da vida, sendo a segunda enfermidade a justificar o auxílio doença, com 7,5% do total das concessões, e a quarta patologia em freqüência (6,2%) a requerer aposentadoria por invalidez². Nos cães o acometimento da OA no joelho é mais evidente com idade próxima aos cinco anos, especialmente nos exemplares de grande porte, e está comumente relacionado com a ruptura do ligamento cruzado cranial (RLCCr)³. Nos humanos, esta estrutura anatômica é equivalente ao ligamento cruzado anterior (LCA)⁴. A ruptura do ligamento em humanos e nos cães, quando não tratada corretamente, acarreta o desenvolvimento da OA com as mesmas manifestações clínicas, macroscópicas e microscópicas^{5, 6, 7}.

São descritos diferentes modelos experimentais para o estudo da OA, utilizando diferentes modelos de experimentação com cães, coelhos e ratos, induzidos através de desmotomia do ligamento cruzado cranial^{8, 9, 10}, menissectomia^{11, 12}, injeção de substâncias nas articulações¹³ e imobilização articular¹⁴. Adicionalmente, o grande número de cães com RLCCr atendidos na clínica, e que evoluem para OA espontânea secundária^{15, 16}, também

constitui uma população significativa e inédita para a pesquisa desta enfermidade.

As raças de cães mais acometidas pela RLCCr são: Labrador, Rottweiler, Boxer, Fila Brasileiro, Chow-Chow e Pit Bull, devido a apresentarem o ângulo do joelho maior que a encontrada em outras raças (superior a 150°), o que ocasiona uma sobrecarga no ligamento cruzado cranial (LCCr), predispondo à ruptura da porção crânio-medial, podendo estar associado a outros fatores como obesidade e traumas^{17,18}. O LCCr pode sustentar aproximadamente 4 vezes o peso corporal do animal antes de se romper completamente^{19,20}.

O suprimento sanguíneo para o LCCr é fornecido principalmente por pequenos vasos oriundos das artérias sinoviais, que se bifurcam em artérias geniculares, onde penetram transversalmente ao ligamento e se anastomosam com os vasos endoligamentosos. O terço médio do ligamento é menos vascularizado que as suas extremidades, representando o fator principal para justificar a ruptura do ligamento. O líquido sinovial também contribui para a nutrição do LCCr^{21,22,23}.

O diagnóstico da RLCCr é realizado através da história clínica, exame físico, que inclui os teste de movimento de gaveta e teste de compressão tibial^{18,24,25,26}, avaliações radiográficas do joelho, ultra-sonografia, ressonância nuclear magnética e artroscopia^{27,28,29,30}. A radiografia é bastante indicada por ser um meio de diagnóstico barato e não invasivo, que permite avaliar o grau de degeneração articular, representado pela diminuição do espaço intra-articular, esclerose óssea subcondral,

neoformações ósseas, originando osteófitos marginais, erosões e cistos ósseos^{15,31,32}. O RX pode sugerir também o diagnóstico da RLCCr, devido ao desvio cranial da tíbia em relação ao côndilo femoral, assim auxiliando na escolha do tratamento e no prognóstico da doença^{7,26,33,34}.

Em consequência da RLCCr, ocorre a instabilidade articular, que evolui rapidamente para OA, e o tratamento requer procedimento cirúrgico para estabilizar a articulação por meio de técnicas extra-articulares ou intra-articulares, associadas ao tratamento clínico^{18,34,35,36}.

Os eventos degenerativos da cartilagem articular no joelho têm início com as lesões sobre os meniscos e a superfície articular dos côndilos femorais e tibiais. Com a progressão da enfermidade, ocorrem mudanças nas células e nos componentes da matriz extracelular, alterando a síntese de colágeno e diminuindo a organização dos condrócitos, levando, conseqüentemente, à perda da matriz fibrilar e dos proteoglicanos^{1,28,37,38,39}.

A patogênese da OA é incerta, mas fatores desencadeantes, como traumas, atuam liberando citocinas pró-inflamatórias pelos condrócitos e pelas células presentes na membrana sinovial, tais como a IL-1 (interleucina-1), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), IL-10 (interleucina-10), IL-6 (interleucina-6) e a quimiocina, como a CCL2/MCP-1^{1,40,41,42,43,44}. Estas citocinas e quimiocinas teriam efeito catabólico, levando à destruição da cartilagem articular pela indução da liberação de enzimas líticas zinco-dependentes, conhecidas como metaloproteases (colagenase, gelatinase, estromelisina), além da diminuição de produção de agentes inibitórios teciduais das metaloproteases (TIMP) e dos inibidores do plasminogênio. A

IL-1 e o TNF- α inibem a síntese de componentes da matriz extracelular, sendo que a IL-1 inibiria a síntese de agrecanos e suprimiria a síntese dos *colágenos* II e IX, que são constituintes próprios da cartilagem, e aumentaria a produção dos colágenos I e III, resultando numa reparação tecidual deficiente^{39,45,46,47,48}.

A análise do líquido sinovial de pacientes humanos e animais com OA mostram alterações quanto a volume, viscosidade, PH, dosagem protéica, aspecto do coágulo de mucina, aumento de enzimas degradativas, contagem total e diferencial de leucócitos^{10,17,49,50,51}.

Neste estudo, tivemos como objetivo caracterizar a OA secundariamente à RLCCr espontânea, analisada em dois tempos distintos que se seguiram à ruptura ligamentar ocorrida em cães adultos, de porte grande, com idade inferior a 5 anos, machos, com peso entre 20 e 45 quilos, anatomicamente classificados como mediolínios ou brevilínios (Labrador, Rottweiler, Boxer, Pit Bull, Chow Chow e Bulldog Inglês).

Objetivo e Justificativa

2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

A proposta deste estudo foi estudar as alterações morfológicas em cartilagem articular, e analisar os aspectos bioquímicos, celulares e inflamatórios do líquido sinovial dos cães com RLCCr. A originalidade do estudo decorre da forma como foi desenhada a pesquisa, que avaliou dois grupos distintos de cães, com datas diferentes da ruptura do ligamento cruzado cranial, permitindo assim, a análise evolutiva dos danos articulares e modificações do líquido sinovial, em modelo experimental espontâneo e ético de osteoartrite canina.

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Seleção dos animais

O estudo contou com a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa, CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de São Paulo, conforme documento nº 464/06, e também do CEP-UMESP sob nº 211/06.

Foram utilizados para o estudo 54 cães anatomicamente classificados como mediolínios ou brevilínios, com o peso variando entre 20 e 45 quilos, machos, adultos e idade inferior a 5 anos, divididos em 2 grupos:

O primeiro grupo foi composto por 27 cães subdivididos em três grupos, sendo 20 cães vivos com RLCCr confirmada após anamnese, exame clínico, exame físico articular e avaliação radiográfica do joelho e operados em diferentes momentos. A avaliação clínica desse grupo quanto ao grau de claudicação foi classificada segundo Tudury e Raiser, 1985⁵². Os outros 7 cães desse grupo eram animais com OA sem RLCCr, oriundos do setor de necropsia do HOVET.

- **RLCCr < 20**, composto por animais (n=10) com ruptura do ligamento cruzado cranial e tempo de lesão, até o ato cirúrgico, menor que 20 dias.
- **RLCCr > 20**, composto por animais (n=10) com ruptura do ligamento cruzado cranial e tempo de lesão, até o ato cirúrgico, maior que 20 dias.
- Grupo controle de **OA** (n= 7): Animais com evidências de OA e sem a RLCCr, apresentando faixa etária e peso semelhantes ao grupo de cães

com RLCCr. Os animais vieram a falecer no HOVET-UMESP de causas diversas e logo após o óbito a articulação foi explorada. A coleta do material foi realizada após ser constatada a osteoartrose macroscópica.

No segundo grupo foram utilizados mais 27 cães sem artropatias, subdivididos em dois grupos normais.

- **CN**, composto por animais normais - Controle (n=7) para o estudo do tecido cartilaginoso, oriundos do C.C.Z., de Santo André, com as mesmas características dos cães com RLCCr, mas com a idade estimada através das características dentárias, segundo Constantinescu (2005b)⁵³ E ao exame articular macroscópico não mostraram sinais evidentes de OA.
- **NL**, composto por animais normais (n=20) que foram usados para o estudo do líquido sinovial, servindo como controles dos ensaios bioquímicos e inflamatórios. Eles foram operados por diferentes causas e não apresentavam OA ou outras alterações reumatológicas.

3.2 Critérios de Inclusão dos animais com RLCCr

Os grupos de animais operados (RLCCr > 20; RLCCr < 20) foram compostos respeitando três critérios: a história clínica (tempo da lesão até o ato cirúrgico), o exame físico (testes de movimento de gaveta cranial positivo e exame positivo de compressão da tíbia) e o peso do animal (Figura 1a e

1b). O tratamento cirúrgico foi realizado através do método de estabilização extra-articular, com a articulação obrigatoriamente explorada, como de rotina, e durante o procedimento cirúrgico o fragmento de cartilagem foi coletado.

Figuras 1a e 1b - Exame físico articular para o diagnóstico da (RLCCr) com o animal em decúbito lateral. Em 1a, teste do movimento de gaveta com o posicionamento das mãos sobre a tíbia e o fêmur, ficando os côndilos femorais seguros e desliza-se o platô tibial para cranial. Em 1b, o teste de compressão tibial realizando a flexão da articulação do tarso, e a tíbia desloca-se cranialmente devido à origem e inserção do tendão do músculo gastrocnêmio.

Fonte: Hulse, Johnson, 2005.

3.3 Critérios de exclusão dos animais com RLCCr

Os animais que apresentavam a RLCCr associada a luxação de patela, displasia coxo-femural, osteocondrite dissecante do joelho, osteocondrose do joelho e diferentes tipos de artrites foram excluídos, assim como os de idade inferior a 1 ano e superior a 5 anos, fêmeas, cães

anatomicamente classificados como longilínios, animais castrados e com peso superior a 45 quilos ou inferior a 20 quilos.

3.4 Avaliação macroscópica

Durante o procedimento cirúrgico dos animais dos grupos RLCCr < 20 e RLCCr > 20, após a artrotomia, a superfície articular foi avaliada e classificada, de acordo com a presença de lesões, em: *normal*, quando a superfície da cartilagem encontrava-se ílesa; *fibrilada*, se houvesse irregularidades na superfície da cartilagem articular, e *fibrilada*, com exposição do osso quando as lesões se aprofundam até o osso subcondral⁵⁴. Estes mesmos critérios foram utilizados para a avaliação dos grupos CN e OA.

3.5 Coleta de materiais

Os exames clínicos e os procedimentos cirúrgicos nos animais dos grupos RLCCr < 20 e RLCCr > 20 foram realizados sempre pelo pesquisador (A.C.S.).

Os fragmentos de cartilagem foram obtidos do côndilo lateral do fêmur dos animais dos grupos RLCCr < 20 e RLCCr > 20, por meio de um “*punch*” de 4 mm e sem lesionar o osso subcondral, após a artrotomia parapatelar

lateral. A coleta de fragmentos de cartilagem dos grupos CN e OA foi realizada no mesmo ponto anatômico dos animais com RLCCr. Posteriormente, o material foi conservado em solução de formaldeído a 10% para análise morfológica.

O líquido sinovial foi coletado dos animais que compõem os grupos RLCCr < 20, RLCCr > 20 e NL no dia da cirurgia, após a sedação do animal, via artrocentese, respeitando os princípios cirúrgicos. Para o procedimento, utilizamos agulhas de calibre 25X08 mm e seringa de 5ml. Após a palpação dos pontos de referência anatômica (patela, ligamento patelar e crista da tíbia), a agulha foi inserida no sentido parapatelar lateral e distal à patela e o conteúdo foi aspirado de forma suave. Parte do conteúdo obtido foi observado imediatamente no laboratório da HOVET- UMESP para a análise física, química e celular. Parte desse material foi armazenado em contêiner de Nitrogênio Líquido, para a realização dos outros estudos referentes às citocinas e quimiocinas, no Laboratório de fisiopatologia da Inflamação da Disciplina de Reumatologia- LIM. 17 do HC-FMUSP.

3.6 Estudo Morfológico

As cartilagens articulares coletadas foram fixadas em solução de formaldeído a 10% e processadas pelos métodos histológicos de rotina. Posteriormente, foram seccionadas perpendicularmente à superfície articular, em cortes de 4µm, coradas pela Hematoxilina-Eosina (H&E) e pelas reações histoquímicas de Sirius red 0,2% em solução saturada de

ácido pícrico - Picrosírius (Direct Red 80, C. I. 35780, Aldrich, Milwaukee, WI) e Safranina-O 0,5% com *Fast-green* 0,1% (Sigma Co.) para avaliação da celularidade, do conteúdo de fibras colágenas e do grau de destruição dos proteoglicanos, respectivamente. Todo o estudo histológico e morfométrico da cartilagem articular foi realizado no Laboratório de Matriz Extra-celular da disciplina de Reumatologia - LIM 17 do HC-FMUSP.

3.6.1 Morfometria

A quantificação dos condrócitos foi realizada pela coloração de H&E, através de método estereológico convencional⁵⁵. Este é um método de contagem de pontos que consiste em um retículo (área: 62500 μm^2) formado por 100 pontos e 50 linhas, cada uma com 25 μm de comprimento, adaptada a um microscópio convencional. Os resultados são expressos na forma de porcentagem, através da correlação entre a quantidade encontrada, dividida pelo total de pontos existentes no retículo sobre a área do tecido.

A avaliação quantitativa da densidade de fibras de colágeno no tecido cartilaginoso foi realizada através da análise de imagem por microscópio da marca Olympus BX51, acoplado a uma câmera digital, utilizando o programa *Image Pro-Plus 6.0*, pela coloração de Picrosírius sob luz polarizada, em 5 campos randomizados.

A avaliação quantitativa da perda de proteoglicanos foi realizada através da análise de imagem com o tecido corado com Safranina-O/fast-

green, utilizando o mesmo microscópio para quantificação de fibras colágenas, e também com análise em 5 campos randomizados.

3.6.2 Avaliação do grau de lesão articular e proteoglicanos na cartilagem

Para a avaliação do grau de lesão articular foi utilizado um escore semi-quantitativo, através da análise da coloração histoquímica dos fragmentos de cartilagem com Safranina-O/ *Fast-green*, por 3 observadores independentes, em 5 campos randomizados, de acordo com a Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (OARSI) e segundo Pritzker et al. (2006)⁵⁶. Este critério tem graduação de 1 a 6, porém, neste estudo, a opção pela preservação do osso subcondral impediu análises sobre remodelamento ósseo e fibro-cartilaginoso (graus 5 e 6).

Conforme a classificação adotada pela OARSI, segundo Pritzker et al. (2006)⁵⁶, o grau 1 mostra a presença de fibrilação articular superficial, formação de sulcos verticais, edema focal ou generalizado da cartilagem, proliferação e hipertrofia dos condrócitos, com formação de aglomerados denominados *clusters*, perda da orientação normal das células, podendo haver também necrose e apoptose dos condrócitos, com condrons vazios ou fantasmas. O Grau 2 é caracterizado por esfoliação, ou destacamento de fragmentos de cartilagem da camada superficial, redução da coloração da matriz pela Safranina-O, refletindo a perda de proteoglicanos nas regiões mais superficiais da cartilagem. No grau 3, as fissuras verticais se estendem até a zona de transição osteo-cartilaginosa, ocorre coloração heterogênea

da matriz pela Safranina-O, com áreas de acentuada marcação, intercaladas com áreas de intensa depleção do corante. As alterações dos condrócitos são mais evidentes, com maior proliferação e desorientação celular e maior apoptose condrocitária, principalmente em regiões próximas às fissuras. No grau 4, aparecem regiões de delaminação e áreas de escavação na cartilagem, com erosões profundas e por vezes coalescentes, associadas à proliferação e morte de condrócitos. Ocorre intenso esmaecimento de coloração pela Safranina-O. Fragmentos que se desprendem da cartilagem podem ser vistos como corpos livres. O grau 5 caracteriza-se por áreas de desnudamento da superfície cartilaginosa, com exposição do osso subcondral subjacente, enquanto no grau 6 evidencia-se intenso remodelamento e deformidade do osso subcondral, podendo haver microfraturas com reparo fibrocartilaginoso e ósseo.

3.7 Avaliação radiográfica

As avaliações radiográficas foram realizadas nos animais dos grupos operados (RLCCr < 20 e RLCCr > 20). No dia da consulta, ou antes do procedimento cirúrgico, foi realizado RX simples do joelho em duas projeções (médio-lateral e crânio-caudal) e o laudo foi emitido por três Médicos Veterinários (HOVET-UMESP e Laboratório FAUNA), segundo critério proposto por Rendano Jr. e Shoup (1998)³² (Quadro 1).

Quadro 1 - Estadiamento Radiográfico do joelho Canino com OA (Rendano Jr e Shoup, 1998) ³²	
GRAU 1:	Sem lesão definida radiograficamente.
GRAU 2:	Discreto aumento de volume de tecido mole no interior da articulação; Discreto deslocamento e compressão da gordura intra e peri-articular.
GRAU 3:	Aumento progressivo no volume do tecido mole no interior da articulação; Deslocamento e compressão adicionais da gordura intra e peri-articular; Discreto aumento de volume de tecido mole em torno da articulação; Discreta produção óssea recente com formação de osteófitos próximos à cápsula articular e às inserções dos ligamentos.
GRAU 4:	Aumento progressivo no volume do tecido mole no interior da articulação; Profundo deslocamento e compressão da gordura intra e peri-articular; Diminuição notável do volume de tecido mole em torno da articulação; Aumento ou diminuição do espaço articular; Agravamento da neoformação óssea com osteófitos desenvolvendo-se em sítios de inserção da cápsula articular; Produção óssea recente nos sítios de inserção dos ligamentos osteófitos.
GRAU 5:	Estágio terminal da doença articular com agravamento do estágio 4 e com alterações adicionais que incluem: mineralização do tecido mole (mineralização peri-articular, osteocondromatose sinovial); formação de ossículos; esclerose subcondral; diminuição ou colapso de espaço articular; cistos subcondrais; alterações do osso trabecular na região epfisária; subluxações; anquilose.

3.8 Análise do líquido sinovial

3.8.1 Análise Físico-Química

O líquido sinovial foi analisado conforme parâmetros citados no quadro 2.

O volume foi mensurado diretamente na seringa após coleta, assim como a análise da coloração do líquido sinovial, que pode ser classificada em incolor, amarelo-palha, xantocrômico e hemoartrósico⁵⁷.

Quadro 2 - Parâmetros de avaliação do líquido sinovial		
PARÂMETROS	ARTICULAÇÃO NORMAL	OSTEOARTRITE
Coloração	Incolor/ Amarela	Amarela
Transparência	Transparente	Transparente
Viscosidade	Muito Alta	Alta
Coágulo de Mucina	Bom	Bom/ Regular
Eritrócitos	Nenhum	Poucos
Leucócitos/ mm ³	< 1000	1000 – 5000
Neutrófilos	< 5%	< 10%
Células Mononucleares	> 95%	> 90%
Proteínas (g/dl)	2,0 – 2,5	2,0 – 3,0
Microorganismos	Nenhum	Nenhum
Adaptado de Schrader et al., 1995 ⁵⁸ ; Bennet, May, 1997 ⁵⁷		

A análise da viscosidade foi realizada instilando-se uma gota de líquido sinovial no polegar, seguindo a metodologia de Altman, Gray (1984)⁵⁹: fez-se leve pressão com o dedo indicador e, ao afastar os dedos, medimos a distância do filamento formado. A viscosidade foi classificada

como normal (até 2,5 cm), aumentada (maior que 2,5 cm) ou diminuída (menor que 2,5cm). A densidade foi avaliada diretamente no refratômetro portátil (Quimis, Q - 767), logo após a coleta, e o pH mensurado com fitas colorimétricas (Papel indicador pH; Merck®).

O teste de Mucina foi realizado instilando-se algumas gotas do líquido sinovial em um recipiente contendo solução de ácido acético. O aspecto físico do coágulo formado reflete o grau de polimerização do ácido hialurônico⁵⁹ e auxilia na predição de processo inflamatório ou degeneração articular. Este precipitado de mucina formado pode ser graduado, segundo Parry (1996)⁶⁰, em Firme (formação de coágulo compacto e grande em solução límpida), Regular (formação de coágulo amolecido em solução discretamente turva) ou Frágil (coágulo friável em solução turva).

3.8.2 Análise da celularidade

Analizou-se a celularidade do líquido sinovial, logo após a sua coleta, dos cães dos grupos RLCCr < 20, RLCCr > 20 e NL, com o objetivo de estudar a contagem celular global e diferencial leucocitária. A técnica de contagem celular foi realizada com câmara de Neubauer, seguida de análise celular diferencial.

3.8.3 Dosagem de IL- 6, IL- 10, TNF- α e CCL2/MCP-1 (Proteína quimioatraente de macrófagos) por ELISA

Para a quantificação das citocinas (IL- 6, IL- 10, TNF- α) e da quimiocina (CCL2/MCP-1), parte do líquido sinovial coletado permaneceu conservado em Nitrogênio Líquido até a data de processamento.

A dosagem das citocinas e da quimiocina foi realizada por kits comerciais (R&D Systems-Quantikine®) homólogos para cães, através da técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as especificações do fabricante. As amostras para dosagem de IL-10 foram diluídas 1:2 e para as demais citocinas o líquido sinovial foi utilizado sem diluição. Foram utilizados 50 μ l de fluido sinovial para os ensaios de IL-10, IL-6 e TNF- α , enquanto para a análise de CCL2/MCP-1 foram necessários 100 μ l. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. A leitura da densidade ótica foi realizada no espectrofotômetro a 450nm.

As amostras com leituras dentro do espectro da curva padrão, com concentrações fornecidas pelo fabricante, foram consideradas positivas.

3.9 Análise estatística

Os dados coletados foram expressos em planilhas descritivas com média e desvio padrão (DP) para todas as variáveis numéricas contínuas, em seguida foram aplicados os testes estatísticos utilizando o programa

SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versão 10.0 para Windows).

Posteriormente, foram aplicados os testes de normalidade, Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-wilk, para definir a frequência de distribuição das variáveis. As variáveis que representavam a quantidade de fibras colágenas, o número de condrócitos e as alterações de proteoglicanos nos grupos controle OA e RLCCr, assim como os ensaios imunoenzimáticos (Elisa), foram classificadas como variáveis numéricas contínuas com distribuição simétrica. O grau de lesão radiológico foi classificado como variável categórica ordinal e a evidência de lesão condral pela Safranina-O/Fast-green, como variável categórica nominal.

A comparação entre os diversos grupos foi feita através de análise pelo método de ANOVA one-way, complementada com o teste de Bonferroni.

Para comparação entre dois grupos diferentes, foi utilizado o Teste-T independente para as variáveis numéricas contínuas. O teste de qui-quadrado foi utilizado para as variáveis categóricas.

O grau de correlação entre as variáveis com distribuição normal foi avaliado pelo coeficiente de Pearson e para a variável categórica ordinal com distribuição assimétrica foi utilizado o teste de Spearman.

O intervalo de confiança adotado foi de 95%, com nível de significância de $\alpha < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação demográfica, clínica e radiológica

Foi realizada avaliação de dados demográficos, clínicos e de exame físico dos animais operados com RLCCr < 20, com amostragem composta por cães de 4 raças: Bulldog Inglês (n=2), Labrador (n=3), Rottweiler (n=1) e Pit Bull (n=4). A idade dos animais variou entre 2 e 5 anos, com peso médio de $28,2 \pm 7,5$ Kg (Média $\pm$ DP), machos e tempo de lesão médio de $9,6 \pm 5$ dias. Todos exame físico positivo para o movimento de gaveta cranial e teste de compressão tibial para a RLCCr. A avaliação radiológica mostrou grau moderado de lesão articular pela OA ($2,5 \pm 1,5$ graus) (Tabela 1A) (Figura 2 e 3) e o exame macroscópico articular revelou uma superfície articular normal (n=1), fibrilada (n=4) ou fibrilada com exposição óssea (n= 5) (Tabela 1B).

Tabela 1A - Avaliação dos cães com RLCCr operados antes de 20 dias

Casos	Raça	Idade (anos)	Peso (kg)	Grau de claudicação	Tempo da lesão (dias)	Movimento de gaveta	Teste de compressão tibial
01	Bulldog	4	28	Moderada	5	Positivo	Positivo
02	Pit Bull	2	25	Discreta	15	Positivo	Positivo
03	Labrador	3.5	35	Discreta	12	Positivo	Positivo
04	Pit Bull	4	34	Discreta	10	Positivo	Positivo
05	Bulldog	4	26	Discreta	5	Positivo	Positivo
06	Pit Bull	3	25	Acentuada	8	Positivo	Positivo
07	Labrador	4	28	Acentuada	13	Positivo	Positivo
08	Pit Bull	3	23	Discreta	5	Positivo	Positivo
09	Labrador	5	20	Moderada	10	Positivo	Positivo
10	Rottweiler	5	38	Acentuada	13	Positivo	Positivo

Tabela 1B - Avaliação do tipo da RLCCr, grau radiológico e classificação macroscópica da lesão na cartilagem articular dos cães operados antes de 20 dias da lesão

Casos	Tipo de ruptura	Grau radiológico	Macroscopia da cartilagem
01	Total	1	Fibrilada
02	Parcial	3	Fibrilada com exposição óssea
03	Total	3	Fibrilada com exposição óssea
04	Total	4	Fibrilada com exposição óssea
05	Parcial	2	Fibrilada
06	Total	3	Fibrilada com exposição óssea
07	Total	3	Fibrilada
08	Total	2	Fibrilada
09	Total	1	Normal
10	Total	3	Fibrilada com exposição óssea

Foi realizada avaliação de dados demográficos, clínicos e de exame físico dos animais operados do grupo RLCCr > 20, com a amostra formada por cães de 4 raças: Boxer (n=1), Labrador (n=3), Rottweiler (n=1) e Pit Bull (n=5). A idade média foi de $4 \pm 2,5$ anos, o peso médio de $29,4 \pm 12$ Kg, machos e com tempo médio de lesão de $39,4 \pm 16$ dias. Todos apresentavam exame físico positivo do movimento de gaveta cranial e no teste de compressão tibial o resultado foi negativo para seis e positivo para quatro cães. O exame radiológico mostrou o grau de gravidade médio de $3,4 \pm 0,5$ graus (Tabela 2A) (Figura 2 e 3) e a superfície articular esteve fibrilada (n=4) ou fibrilada com exposição óssea (n= 6) (Tabela 2B).

Tabela 2A - Avaliação clínica e exame físico articular do grupo de cães com RLCCr operados após 20 dias da lesão

Casos	Raça	Idade (anos)	Peso (kg)	Grau de claudicação	Tempo da lesão (dias)	Movimento de gaveta	Teste de compressão da tíbia
01	Pit Bull	4	32	Severa	35	Positivo	Negativo
02	Rottweiler	4	44	Severa	25	Positivo	Positivo
03	Pit Bull	1.7	23	Discreta	20	Positivo	Negativo
04	Labrador	5	28	Moderada	52	Positivo	Positivo
05	Labrador	5	20	Moderada	22	Positivo	Positivo
06	Boxer	5	24	Moderada	30	Positivo	Negativo
07	Pit Bull	3	29	Severa	45	Positivo	Negativo
08	Pit Bull	3	32	Severa	60	Positivo	Negativo
09	Labrador	3	36	Severa	30	Positivo	Positivo
10	Pit Bull	4	26	Moderada	30	Positivo	Negativo

Tabela 2B - Avaliação do tipo de RLCCr, grau radiológico e classificação macroscópica de lesão na cartilagem articular dos cães operados após 20 dias da lesão

Casos	Tipo de ruptura	Grau radiológico	Macroscopia da cartilagem
01	Parcial	4	Fibrilada com exposição óssea
02	Total	3	Fibrilada
03	Total	3	Fibrilada
04	Total	3	Fibrilada
05	Total	4	Fibrilada com exposição óssea
06	Total	4	Fibrilada
07	Parcial	3	Fibrilada com exposição óssea
08	Total	3	Fibrilada com exposição óssea
09	Parcial	4	Fibrilada com exposição óssea
10	Total	3	Fibrilada com exposição óssea

Figura 2 - Comparação da intensidade de claudicação e comprometimento radiológico entre os grupos de cães com diferentes tempos de RLCCr.

(#) (*) - Estatisticamente significativo pelo método estatístico de Spearman:

Claudicação > 20 dias vs tempo < 20 dias, $p=0,03$.

Grau radiológico > 20 dias vs tempo < 20 dias, $p<0,05$.

O grau de claudicação é descrito como: Graus; 1, normal; 2, claudicação discreta- somente após o exercício; 3, claudicação moderada – ao caminhar e correr; 4, claudicação severa – ao caminhar e elevação do membro ao correr; e 5, impotência funcional do membro (Tudury e Raiser, 1985)⁵².

Figura 3 – Diferentes graus de OA ao estudo radiológico dos cães operados com RLCCr, de acordo com critério de Rendano Jr e Shoup (1985)³².

Grau (1) - Articulação normal; Grau (2) - Aumento de volumes das partes moles intra-articulares e discretos osteófitos em patela; Grau (3) - Discreta proliferação osteofítica em tuberosidade da tíbia e sulco troclear aumento de volumes das partes moles intra-articulares; Grau (4) - Diminuição do volume das partes moles intra-articulares, proliferação osteofítica em patela e côndilo medial e lateral do fêmur, alterações morfológicas em fabelas e crista da tíbia, áreas de esclerose e lise sub-condral nos côndilos da tíbia e do fêmur; Grau (5) – Esclerose e lise subcondral, osteófitos periarticulares, diminuição da inter-linha e calcificação de tecidos moles intra-articulares.

A Tabela 3A mostra o grupo de cães controle com OA e a Tabela 3B demonstra sete cães sem OA (CN). Estes animais controle, com e sem OA, tiveram as articulações examinadas macroscopicamente e fragmentos coletados imediatamente após o óbito.

Tabela 3A - Grupo controle com osteoartrite (OA)

Casos	Origem	Raça	Causa Mortis	Idade	Membro
01	Metodista	Labrador	Corpo-estranho	2 ANOS	Esquerdo
02	Metodista	Rottweiler	Fratura de coluna	3 ANOS	Esquerdo
03	Metodista	Pit Bull	Intussuscepção	2 ANOS	Direito
04	Metodista	Pit Bull	Poli-fraturado	4 ANOS	Direito
05	Metodista	Rottweiler	Trauma balístico	5 ANO	Direito
06	Metodista	Pit Bull	Intussuscepção	2 ANO	Esquerdo
07	Metodista	Chow-Chow	Pancreatite traumática	5 ANOS	Direito

Tabela 3B - Grupo controle sem osteoartrite (CN)

Casos	Origem	Raça	Causa Mortis	Idade aproximada	Membro
01	C.C.Z.	Rottweiler	-----	2 ANOS	Direito
02	C.C.Z.	Pit Bull	-----	2 ANOS	Direito
03	C.C.Z.	Pit Bull	-----	4 ANOS	Esquerdo
04	C.C.Z.	Pit Bull	-----	3 ANOS	Direito
05	C.C.Z.	Pit Bull	-----	1 ANO	Esquerdo
06	C.C.Z.	Rottweiler	-----	1 ANO	Esquerdo
07	C.C.Z.	Pit Bull	-----	3 ANOS	Direito

C.C.Z.- Centro de controle de Zoonoses

4.2 Análise morfológica da cartilagem articular

A avaliação da celularidade pela coloração com H&E da cartilagem articular dos animais com RLCCr e operados antes de 20 dias (Figura 5A) revelou irregularidades da superfície articular, diminuição de condrócitos e presença de “*clusters*” distribuídos de forma irregular na cartilagem, características semelhantes às alterações encontradas no grupo controle OA (Figura. 4D).

Nos animais com RLCCr após 20 dias, foi observada intensa irregularidade da superfície articular, diminuição expressiva de condrócitos, presença de “*clusters*” na região intermediária da cartilagem e formação fibrocartilaginosa na superfície articular, caracterizando um processo degenerativo mais grave (Figura 5D). Em contraste, a cartilagem dos animais do grupo Controle Normal (CN) apresentou-se, na maioria dos casos, com discreta irregularidade da superfície articular e tênue desorganização celular (Figura 4A).

A análise da rede de colágeno através da coloração de Picrosírius sob luz polarizada nos animais do grupo RLCCr antes de 20 dias mostrou desorganização da rede de fibras de colágeno, com remodelamento, caracterizada pela diminuição da birrefringência (vermelha alaranjada) (Figura 5B), indicando uma perda das fibras de colágeno semelhante à exibida pelo grupo com OA (Figura 4E). O grupo CN mostrou integridade da rede de colágeno, caracterizada pela birrefringência em vermelho, disposta de forma homogênea em toda a superfície da cartilagem (Figura 4B).

Nos animais do grupo RLCCr após 20 dias, observa-se importante alteração histológica, representada pela mudança na birrefringência de vermelho-arrocheada para amarelo-esverdeada, o que indica um intenso remodelamento de fibras colágenas e o aparecimento de fibras grossas (vermelho), dispostas de forma heterogênea e desordenada, revelando a produção fibrocartilaginosa na superfície articular neste grupo (Figura 5E).

A avaliação dos proteoglicanos através da coloração de Safranina-O/*Fast-green*, na cartilagem articular dos animais do grupo RLCCr antes de 20 dias, mostrou haver aumento moderado da coloração azulada na região superficial da cartilagem (Figura 5C), coincidindo com as alterações celulares encontradas na coloração de H&E do mesmo grupo (Figura 5A). No grupo controle OA (Figura 4F), observa-se intenso aumento da coloração azulada, indicando diminuição no conteúdo de proteoglicanos teciduais. Em contraste, no grupo CN, nota-se uma coloração vermelho-alaranjada da cartilagem, com leve coloração azulada na superfície, revelando preservação de proteoglicanos, dispostos de forma homogênea e com pequena perda destas proteínas de matriz na região superficial (Figura 4C) .

Figura 4 - Cortes histológicos de cartilagem articular dos animais dos grupos normais. Os tecidos foram corados com H&E, Picrosírius e Safranina-O/*fast-green*. Em A, observamos superfície articular homogênea e pequena desorganização condrocitária (seta). Em D, verificamos irregularidades na superfície articular (seta grossa) e desorganização celular (seta fina). Em B, é possível notar, em vermelho, integridade da rede de fibras colágenas (seta); em E, vê-se alterações na rede de colágeno, com formação de fibras grossas (seta). Em C, existe integridade da matriz cartilaginosa (proteoglicanos), demonstrada pela coloração avermelhada da cartilagem (seta). Em F, percebe-se em azul a perda de proteoglicanos, predominantemente, na região superficial da cartilagem (seta). Notar a diferença do grupo com osteoartrite em relação ao grupo normal (Aumento: 200X).

Figura 4

Figura 5 - Cortes histológicos de cartilagem articular dos animais operados com RLCCr, os tecidos foram corados com H&E, Picrosírius e Safranina-*O/fast-green*. Em A, observamos irregularidades na superfície, diminuição de condrócitos, com presença de *clusters* de condrócitos (seta). Em D, está demonstrada formação fibrocartilaginosa na superfície articular (seta). Em B e E, existem alterações na rede de colágeno (seta); notar em E, mudanças na birrefringência (seta preta) e presença de fibras grossas e irregulares (seta branca). Em C e F, observar em azul a perda de proteoglicanos e, em F, o predomínio desta coloração na formação fibrocartilaginosa. Nota-se a evolução do processo degenerativo da cartilagem do grupo RCCr > 20 dias em relação ao grupo RCCr < 20 dias (Aumento: 200X).

FIGURA 5

4.3 Análise morfométrica

A quantificação de condrócitos na cartilagem articular do grupo com RLCCr < 20 dias ($6,78 \pm 1,35$) mostrou aumento significativo destas células, quando comparadas ao grupo CN ($5,51 \pm 0,6$), e diminuição da celularidade, quando comparadas ao grupo OA ($7,5 \pm 1,5$). No grupo RLCCr > 20 dias, nota-se intensa diminuição da quantidade de condrócitos ($3,59 \pm 1,2$) em relação aos grupos controles e RLCCr < 20 dias (Figura 6).

A análise quantitativa das fibras de colágeno na cartilagem articular do grupo com RLCCr < 20 dias ($7,92 \pm 1,08$) mostrou aumento significativo destas fibras, quando comparado ao grupo CN ($3,8 \pm 1,02$), e diminuição, quando comparamos ao grupo OA ($5,7 \pm 0,91$). No grupo RLCCr > 20 dias, observa-se intensa diminuição da quantidade de colágeno ($1,78 \pm 0,79$) em relação aos grupos controles e RLCCr < 20 dias (Figura 6).

A análise quantitativa do escore histológico de OARSI do grupo com RLCCr > 20 dias ($20\% \pm 5$) foi superior aos outros grupos. E o grupo controle OA ($12\% \pm 2$), assim como < 20 dias ($10\% \pm 2$), foi superior ao grupo controle (Figura 6).

A análise semi-quantitativa do escore histológico de OARSI do grupo com RLCCr < 20 dias ($2,5 \pm 0,5$) foi semelhante à observada no grupo controle com OA ($2,5 \pm 0,50$), que foi superior ao grupo controle normal CN ($1,2 \pm 0,25$). No grupo RLCCr > 20 dias, houve aumento no escore de lesão

na cartilagem ($3.0 \pm 0,5$) em relação ao grupo controle e ao RLCCr < 20dias (Figura 7; Tabela 4).

Figura 6 – Avaliação morfométrica do tecido cartilaginoso em diferentes colorações nos grupos de cães operados RLCCr < 20 dias e RLCCr >20 dias, e nos grupos controle com OA e cartilagem normal (CN).

Estatisticamente significativo pelo teste estatístico ANOVA one-way (Bomferroni):

Condrocitos: o grupo Controle vs OA, $p=0,001$; Controle vs <20dias, $p=0,02$; Controle vs >20dias, $p<0,001$; OA vs <20dias, $p=0,01$; OA vs >20dias, $p<0,001$; <20dias vs <20dias, $p<0,001$;

Colágeno: o grupo Controle vs OA, $p=0,01$; Controle vs <20dias, $p<0,001$; Controle vs >20dias, $p=0,001$; OA vs <20dias, $p=0,001$; OA vs >20dias, $p<0,001$; <20dias vs <20dias, $p<0,001$;

Safranina O/Fast Green: o grupo Controle vs OA, $p=0,001$; Controle vs <20dias, $p=0,03$; Controle vs >20dias, $p<0,001$; OA vs <20dias, $p=0,001$; OA vs >20dias, $p<0,001$; <20dias vs <20dias, $p<0,001$;

Figura 7 – Análise semi-quantitativa da perda de proteoglicanos nos grupos de cães operados RLCCr < 20 dias e RLCCr > 20 dias, e nos animais dos grupos controle com OA e cartilagem normal (CN).

(*):Estatisticamente significante pelo método estatístico de Spearman:

Os resultados foram estatisticamente significativos para cães operados RLCCr >20 dias vs Controle ($p < 0,001$), RLCCr <20 dias vs Controle ($p < 0,002$); OA vs Controle ($p < 0,002$).

Tabela 4 - Ocorrência dos casos estudados através do método semi-quantitativo para o escore histológico do tecido cartilaginoso na coloração de Safranina O/fast green.

Graus de Safranina- O/Fast green	Controle (CN)	AO	RLCCr < 20	RLCCr > 20
Grau 1,0	N=4 (57,1%)			
Grau 1,5	N=3 (42,9%)		N=3 (30%)	
Grau 2,0		N=3 (37,5%)		N=5 (50%)
Grau 2,5		N=1 (14,3%)	N=4 (40%)	
Grau 3,0		N=3 (42,9%)	N=2 (20%)	N=2 (20%)
Grau 3,5			N=1 (10%)	N=3 (30%)
Grau 4,0				
Grau 4,5				
N= número de casos				

4.4 Análise do líquido sinovial

O volume médio do líquido sinovial nos animais dos diferentes grupos foi: RLCCr < 20 dias ($2,4 \pm 1,8\text{ml}$) , RLCCr > 20 dias ($1,6 \pm 0,8\text{ml}$) e grupo controle NL ($0,6 \pm 0,2\text{ml}$). A análise da viscosidade e o teste do coágulo de mucina foram normais em todos os cães do grupo NL, enquanto em 8/10 cães do RLCCr < 20 dias e 7/10 animais do grupo RLCCr >20 dias encontravam-se alterados. A avaliação da viscosidade do líquido sinovial do grupo RLCCr < 20 dias esteve diminuída em relação ao grupo controle ($2,3 \pm 0,94\text{ cm}$), assim como nos animais do grupo RLCCr > 20 dias ($2,2 \pm 0,78\text{ cm}$). O coágulo de mucina do grupo RLCCr < 20 dias ($1,8 \pm 0,27$) encontrava-se fragilizado em relação ao grupo controle ($2,7 \pm 1$), assim como nos animais operados RLCCr > 20 dias ($1,1 \pm 0,48$) (Tabela 5, 6 e 7) (Figura 8).

O pH no líquido sinovial dos grupos RLCCr < 20 dias ($8 \pm 0,5$) e RLCCr > 20 dias ($8 \pm 0,5$) estava diminuído em relação ao grupo controle ($8,6 \pm 1$) (Tabela 5, 6 e 7) (Figura 8).

A dosagem protéica no líquido sinovial do grupo RLCCr < 20 dias ($2,91 \pm 0,5$) apresentou-se aumentada em relação ao grupo controle ($2,3 \pm 1,1$). Os cães operados com RLCCr > 20 dias ($3,1 \pm 0,5$) apresentaram elevação na concentração protéica do fluido sinovial (Tabela 5, 6 e 7) (Figura 8).

A contagem global de leucócitos no fluido sinovial de cães operados esteve aumentada tanto nos animais com lesão RLCCr < 20 dias ($2990 \pm 1350/\text{mm}^3$), como nos do grupo RLCCr > 20 dias ($3050 \pm 760/\text{mm}^3$),

quando comparados aos animais do grupo controle ($250 \pm 120\text{mm}^3$). Quanto à contagem diferencial de leucócitos, houve tendência no aumento de neutrófilos em relação aos mononucleares no líquido sinovial dos animais com RLLCr (Anexo: Tabela 12,13 e 14) (Figura 9A e 9B).

Tabela 5. Estudo da viscosidade, teste do coágulo de mucina, dosagem protéica e mensuração do pH no líquido sinovial dos cães com RLLCr operados antes de 20 dias da lesão

Casos	Cor	Viscosidade	Coagulo de mucina	Densidade	pH	Proteína g/dl
01	Hemoartrose	Diminuída	Regular	1010	8	3.2
02	Hemoartrose	Diminuída	Frágil	1006	8	3.2
03	Hemoartrose	Diminuída	Frágil	1006	8.0	3.2
04	Hemoartrose	Diminuída	Regular	1008	8.5	3.0
05	Hemoartrose	Diminuída	Regular	1005	8.0	2.5
06	Amarelo-palha	Normal	Frágil	1008	8.5	2.3
07	Xantocromia	Aumentada	Regular	1005	7.5	2.8
08	Amarelo-palha	Normal	Firme	1006	8.0	2.8
09	Xantocromia	Diminuída	Regular	1015	7.5	3.0
10	Hemoartrose	Normal	Frágil	1010	7.5	3.1

Tabela 6. Estudo da viscosidade, teste do coágulo de mucina, dosagem protéica e mensuração do pH no líquido sinovial dos cães com RLCCr operados após 20 dias da lesão

Casos	Cor	Viscosidade	Coagulo de mucina	Densidade	pH	Proteína g/dl
01	Amarelo-palha	Aumentada	Regular	1022	8	3.2
02	Hemoartrose	Diminuída	Frágil	1020	8.5	3
03	Hemoartrose	Diminuída	Frágil	1015	8	3.5
04	Hemoartrose	Diminuída	Frágil	1006	8	2.8
05	Amarelo-palha	Aumentada	Frágil	1020	8.5	2.5
06	Trans-lúcido	Aumentada	Regular	1012	8	3.2
07	Amarelo	Aumentada	Frágil	1008	7.5	2.8
08	Amarelo	Normal	Frágil	1018	8	3.5
09	Xantocromia	Normal	Frágil	1022	7.5	3
10	Hemoartrose	Diminuída	Regular	1022	8	3.2

Tabela 7. Estudo da viscosidade, teste do coágulo de mucina, dosagem protéica e mensuração do pH no líquido sinovial dos cães do grupo controle sem osteoartrite

Casos	Cor	Viscosidade	Coagulo de mucina	Densidade	pH	Proteína g/dl
1	Translúcido	Normal	Firme	1010	8	2.2
2	Translúcido	Normal	Firme	1015	9	2.3
3	Translúcido	Normal	Firme	1015	9	2
4	Translúcido	Normal	Firme	1020	9	2.4
5	Amarelo-palha	Normal	Firme	1006	9	2.2
6	Amarelo-palha	Aumentada	Firme	1015	8	2.3
7	Translúcido	Aumentada	Regular	1013	9	2.8
8	Translúcido	Normal	Firme	1011	8	2
9	Translúcido	Normal	Firme	1024	8	3.2
10	Translúcido	Normal	Firme	1016	9	2.3
11	Amarelo-palha	Normal	Firme	1018	9	2.2
12	Amarelo-palha	Diminuída	Firme	1015	9	2.4

13	Amarelo- palha	Diminuída	Firme	1018	8	2.3
14	Amarelo- palha	Aumentada	Regular	1013	9	2.5
15	Amarelo- palha	Normal	Firme	1018	9	2.2
16	Translúcido	Normal	Firme	1010	8.5	2.1
17	Translúcido	Normal	Firme	1020	8	2
18	Translúcido	Normal	Firme	1015	8	2.5
19	Translúcido	Aumentada	Firme	1017	9	2.7
20	Amarelo- palha	Normal	Firme	1015	9	2

Figura 8 – Análise das propriedades físico-químicas do líquido sinovial dos animais operados com RLCCr e Controle normal (NL).

(*), (#), (+), (&):Estatisticamente significativo pelo método ANOVA one-way (Bomferroni).

Viscosidade: o grupo RLCCr < 20 dias vs controle, $p < 0,03$; RLCCr > 20 dias vs controle, $p < 0,05$.

Mucina: o grupo RLCCr < 20 dias vs controle, $p < 0,001$; RLCCr > 20 dias vs controle, $p < 0,05$.

pH: o grupo RLCCr < 20 dias vs controle, $p < 0,03$; RLCCr > 20 dias vs controle, $p < 0,002$.

Proteína: o grupo RLCCr < 20 dias vs controle, $p < 0,002$; RLCCr > 20 dias vs controle, $p < 0,05$.

Figura 9A e 9B - Análise da celularidade do Líquido sinovial dos animais operados com RLCCr e Controle normal (NL).

(*) :Estatisticamente significativo pelo método ANOVA one-way (Bomferroni).

Contagem global de células: o grupo RLCCr < 20 dias vs controle, $p < 0,03$; RLCCr > 20 dias vs controle, $p < 0,05$.

(#), (+). Estatisticamente significativo pelo método ANOVA one-way (Bomferroni).

Contagem diferencial: o grupo RLCCr < 20 dias vs controle, $p < 0,03$; RLCCr > 20 dias vs controle, $p < 0,05$.

4.5 Dosagem de Citocinas (IL-6, IL-10, TNF- α) e da Quimiocina CCL2/MCP-1

A expressão da quimiocina CCL2/MCP-1 no fluido sinovial foi mais expressiva no grupo RLCCr < 20 dias ($2052,57 \pm 7,26$ pg/ml), seguida do grupo RLCCr >20 dias ($1585,91 \pm 180,5$ pg/ml), em comparação com animais do grupo NL ($1015,25 \pm 18,10$ pg/ml) (Figura 10).

A IL-6 apresentou maior concentração no grupo RLCCr > 20 dias ($886,17 \pm 246,19$ pg/ml), valor estatisticamente significativo quando comparado aos valores obtidos nos grupos RLCCr < 20 dias ($333,38 \pm 242,19$ pg/ml) e NL (249 ± 82 pg/ml) (Figura 10).

A concentração da citocina IL-10 no líquido sinovial não variou nos grupos estudados: NL ($9,38 \pm 4,46$ pg/ml), RLCCr < 20 dias ($2,5 \pm 2,76$ pg/ml) e RLCCr >20 dias ($2,76 \pm 2,76$ pg/ml) (Figura 10).

Igualmente, a dosagem da citocina TNF- α não oscilou no líquido sinovial nos grupos: NL ($3,02 \pm 0,78$ pg/ml), RLCCr < 20 dias ($3,36 \pm 1,28$ pg/ml) e RLCCr > 20 dias ($2,95 \pm 1,02$ pg/ml) (Figura 10).

Figura 10 – Expressão da quimiocina CCL2/MCP-1 e das Citocinas IL-6; IL-10 e TNF- α nos animais operados de RLCCr e cães do grupo controle normal (NL).

(*): Representa a relação de significância entre os grupos de animais operados RLCCr < 20 dias e RLCCr > 20 dias, onde todos eles estatisticamente diferentes do grupo controle normal do líquido sinovial, através da análise estatística dos grupos com o Teste-T, sendo o $p < 0,05$.

Em A está representada a concentração da quimiocina CCL2/MCP-1, mais expressiva nos animais do grupo RLCCr < 20 dias. Em B, a maior expressão da citocina IL-6 foi verificada nos animais do grupo RLCCr > 20 dias. Em C e D não ocorreu expressão significativa para as citocinas IL-10 e TNF- α .

Discussão

5 DISCUSSÃO

O nosso estudo em cães com a ruptura do ligamento cruzado cranial, divididos em dois grupos distintos, conforme o tempo de lesão ligamentar, além de original, trouxe importantes contribuições quanto a inúmeros aspectos ligados à patogênese da osteoartrite. Confirmamos a maior ocorrência de RLCCr nas raças Pit Bull, Rottweiler e Labrador, com idades entre 2 e 4 anos, e como a gravidade da degeneração articular esteve associada diretamente com o tempo de lesão. Estes aspectos também foram relatados por Hulse e Johnson (2005)¹⁸. Segundo Morris e Lipowitz (2001)⁶¹ 25% das RLCCr ocorrem em cães da raça Rottweiler em idade inferior a 4 anos, estando associadas diretamente com a inclinação do joelho, superior a 150°, que ocasiona sobrecarga ao ligamento. Outros fatores desencadeantes são os traumas repetitivos, que ocorrem no ato da corrida e frenagem^{63,63}, ou o estreitamento congênito da fossa intercondilar⁶⁴. Já foi determinado que o ponto principal onde acontece a ruptura ligamentar no cão é o terço médio da faixa craniomedial, pois esta região apresenta fisiologicamente diminuição da irrigação sanguínea^{17,25,63,65}.

Ao avaliarmos o grau de acometimento radiológico do joelho devido à OA, segundo Rendano Jr e Shoup. (1998)³², vimos que a piora da Imagem estava associada ao tempo de lesão e à intensidade da claudicação. Os nossos dados estão de acordo com os achados de Fujita et al. (2006a)⁶, que estudaram radiograficamente 36 cães com RLCCr. Na nossa casuística,

chama a atenção o surgimento precoce de osteófitos, especialmente nos cães com mais tempo de comprometimento articular. Normalmente este remodelamento ósseo em humanos é tardio, diferente do observado em cães. Segundo Rayward et al. (2004)⁶⁶, os osteófitos surgem nas bordas da tróclea após duas semanas da transecção do LCCr e, segundo Biasi (2005)⁶⁷, aparecem após 30 dias da lesão do LCCr. Dupuis e Harari (1993)⁶⁸ observaram alterações radiográficas após quatro semanas de evolução. Estes dados mostram que a osteoartrite induzida pela RLCCr é grave e de rápida evolução, ao contrário do observado em humanos com lesão ligamentar de joelhos.

Do ponto de vista clínico e de exame físico, a claudicação foi pior nos animais com tempo maior de RLCCr. E foi curioso constatar que alguns animais deixaram de ter semiologia positiva para lesão de ligamento cruzado cranial, indicando que houve possível processo de fibrose sinovial, que teria contribuído para a estabilização articular.

Em relação ao exame macroscópico articular, verificamos a ocorrência de alterações na cor e textura da cartilagem, fibrilações e presença de osteófitos nos cães, já visíveis com menos de 20 dias de RLCCr, confirmando os achados radiológicos. Estes dados são semelhantes aos obtidos por Velosa et al. (1999)⁵⁴ em coelhos com 3 a 14 semanas após meniscectomia parcial. Esses resultados também foram encontrados nos animais do grupo controle OA, mesmo sem a RLCCr, com menor incidência de osteófitos. Convém lembrar que o grupo controle de OA não tinha histórico de RLCCr, admitindo-se que a osteoartrite tenha evoluído de forma

mais lenta e menos traumática. Nos cães com ruptura ligamentar superior a 20 dias, o exame macroscópico revelou lesões mais pronunciadas, como exposição óssea, osteófitos com pinçamento da sinóvia e diminuição do espaço articular. Alterações semelhantes foram encontradas por Velosa et al. (1999)⁵⁴ em modelo experimental de coelhos após 22 semanas de menissectomia parcial.

O estudo histológico do grupo controle sem OA revelou que esses cães, mesmo sendo jovens, apresentavam pequenas alterações morfológicas compatíveis com OA inicial, corroborando os relatos de Morris e Lipowitz (2001)⁶¹, Hulse e Johnson (2005)¹⁸ e Echigo et al. (2006)⁶⁹.

Julgamos muito importante a inclusão do grupo controle com OA, pois os animais que desenvolveram degeneração articular de forma menos agressiva, possivelmente, tiveram patogênese distinta das que se seguiram às lesões histológicas e radiográficas com artrose por RLCCr, devido às alterações inflamatórias e ao remodelamento cartilaginoso ocorrerem mais lentamente. Inúmeros parâmetros analisados, como os histológicos, bioquímicos e celulares, sugerem que o grupo de cães denominados OA teve complicações leves de OA, mais sugestivas de processos reparativos. Apesar desta diferença, o modelo da instabilidade articular causada pela RLCCr mostra tratar-se de um bom modelo para o entendimento da patogênese da osteoartrite, especialmente, se realizado comparativamente em tempos diferentes de lesão ligamentar.

O estudo histológico nos cães com RLCCr < 20 dias de lesão e nos cães do grupo controle com OA mostrou irregularidades na superfície

articular e diminuição de condrócitos nesta região cartilaginosa, embora a contagem global de células nestes grupos tenha sido superior a do grupo controle sem OA. Notou-se no grupo precoce de RLCCr um remodelamento da rede de colágeno na matriz extracelular (MEC), caracterizada pelo aumento da birrefringência na coloração pelo Picrosírius sob luz polarizada, indicando ter havido aumento no conteúdo total de colágeno, sugerindo tentativa de reparação tecidual. O escore de gravidade histológica (OARSI - Pritzker et al., 2006)⁵⁶ no grupo RLCCr < 20 dias variou entre 2 a 3 graus na maioria dos casos, semelhante ao grupo controle de OA.

Esse padrão de aumento no remodelamento das fibras colágenas e proliferação de condrócitos em estágios iniciais de OA foi também relatado por Velosa et al.(1999)⁵⁴ em coelhos com 3 e 14 semanas pós-indução de OA, com aumento na síntese de colágenos e proliferação celular, como tentativa de reparação do tecido cartilaginoso, após instalação de trauma mecânico. Estas alterações foram igualmente relatadas em diversos outros modelos de estudos experimentais induzidos^{38,51,70-76}.

No grupo de cães com RLCCr > 20 dias, o exame histológico mostrou intensa irregularidade da superfície articular, expressiva diminuição no número de condrócitos e formação de aglomerados celulares conhecidos como “*clusters*” na região intermediária da cartilagem articular. Essa diminuição da população de condrócitos na cartilagem foi igualmente reportada por Clements et al. (2006)⁷⁷ após estudarem cartilagem de humanos idosos. Neste grupo tardio de lesão de ligamento cruzado, ainda foi observada total desorganização da rede de fibras de colágeno na

cartilagem, semelhante ao observado por Yeh et al. (2007)⁷⁸, que analisaram a intensidade da degeneração articular pelo escore de Mankin. Adicionalmente, no grupo RLCCr>20 dias houve a diminuição expressiva no conteúdo de colágeno identificado pela coloração com Picrosirius, resultado igualmente observado por Velosa et al.(1999)⁵⁴ nos coelhos com tempo prolongado de lesão parcial de menisco.

No nosso estudo, notamos que no líquido sinovial de cães operados antes dos 20 dias de RLCCr houve aumento no número de leucócitos, principalmente de neutrófilos, possivelmente secundário ao processo inflamatório sinovial, decorrente da instabilidade articular que se seguiu ao trauma agudo. Este fato foi também relatado por Taylor (1998)⁷⁹ em 10 cães e por Borges et al. (1999)⁸⁰ em 6 cães, após analisarem 49 articulações com RLCCr total ou parcial. Nos cães com história de RLCCr superior a 20 dias, notamos diminuição na viscosidade do líquido sinovial (LS) e fragilidade do coágulo de mucina, indicativos da diminuição na concentração de ácido hialurônico, sugerindo persistência do processo inflamatório, apesar da aparente normalização no número de células no líquido sinovial.

A queda do pH e o aumento na concentração protéica no LS são outros parâmetros que indicam presença do processo inflamatório sinovial. Nossos resultados são semelhantes aos relatados por Altman e Gray (1984)⁵⁹ e Biasi (2001)¹⁰, que após induzirem a doença, pela desmotomia do ligamento cruzado cranial (técnica de Pond e Nuki), em 19 cães, observaram aumento na contagem de leucócitos no LS, que estava constituído por 95% de células mononucleares, como linfócitos, monócitos e sinoviócitos.

Segundo Silva Jr et al. (2008)⁸¹, acredita-se que o processo inflamatório gerado por estresse mecânico seja fundamental na fisiopatologia da OA, e no presente modelo experimental de osteoartrite canino, o processo inflamatório tende a ser persistente.

A quimiocina MCP-1 é um potente quimiotático para monócitos, basófilos, células NK e linfócitos T, que induz a liberação de histamina, leucotrieno C4 e enzimas, regula a expressão de várias moléculas de adesão e citocinas. Este marcador esteve mais expresso no grupo de cães com RLCCr < 20 dias, explicando o aumento de leucócitos no líquido sinovial de animais deste grupo. Este padrão de resposta também foi reportado por Janeway et al. (2002)⁸² e Kyriakides, et al. (2004)⁸³. É importante salientar que Young et al. (2001)⁷⁴ verificaram que a injeção intra-articular de glicocorticóide não interferiu nas concentrações de MCP-1 e metaloproteinases no estudo em humanos. Dankbar et AL. (2007)⁸⁴ verificou, em ensaio com 41 pacientes, que o nível do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) tem a propriedade de modular síntese de MCP-1 nos fluidos sinoviais, estando relacionado com a formação de osteófitos.

Nossos dados demonstraram que a IL-6 foi a citocina mais expressiva no grupo RLCCr > 20 dias. A produção de IL-6 é estimulada pela IL-1 e TNF- α e tem função pleiotrópica e ação pró-inflamatória, regulando a produção de anticorpos, auxiliando a proliferação de condrócitos e inibindo a produção de proteoglicanos e TIMP em humanos (Fujita et al., 2006b)⁸⁵. As células que liberam IL-6 são: fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, queratinócitos, linfócitos T e B, osteócitos, osteoblastos e mastócitos, as quais estão presentes na fase tardia da lesão inflamatória^{86,87}.

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença de expressão de TNF- α entre o grupo normal e o com RLCCr. Estes resultados foram semelhantes aos mostrados por McNearney et al. (2004)⁸⁸, que não observaram aumento de TNF- α e IL-10 em diversas artropatias em cães. Estes achados foram diferentes dos descritos por Hegemann et al. (2004), possivelmente, devido a esses autores utilizarem ensaios imunoenzimáticos não homólogos para cães. Por outro lado, McNearney et al. (2004)⁸⁸ constataram aumento de TNF- α e IL-10 em casos de artrite reumatóide canina, mas não nos casos de OA.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Através da análise dos dados obtidos neste trabalho, concluímos que:

1- O estudo da ruptura espontânea do ligamento cruzado cranial em cães de grande porte, analisada em dois tempos distintos, é muito interessante para a compreensão da patogênese da osteoartrite, pois mostra de forma seqüencial e evolutiva as alterações clínicas, semiológicas, radiológicas, histológicas e do fluido sinovial. Existe um estágio inicial, caracterizado por intenso processo inflamatório, com tentativa de reparo da cartilagem articular, e um mais tardio, menos inflamatório e com predomínio de remodelamento, causando diminuição de células, falência na síntese de componentes matriciais e neoformação óssea.

2- A osteoartrite canina que se segue à RLCCr tem rápida evolução, sendo portanto um bom modelo para o estudo da patogênese da OA, mas, talvez, inadequado para testar a ação de drogas moduladoras desta enfermidade. É importante ressaltar que cães com RLCCr, quando operados, continuam a desenvolver osteoartrite lentamente, tornando-se um grupo experimental interessante para estudo de drogas, especialmente se associado à artroscopia, que permite visualização do espaço articular e retirada de fragmentos para estudos histológicos.

Anexos

7 ANEXOS

Tabela 8 - Quantificação de condrócitos (H&E) e colágeno (Picrosírius) na cartilagem articular de animais com RLCCr operados antes de 20 dias de lesão.

Casos	Condrócitos %	Colágeno []
01	7.5	6.9
02	6.2	9.52
03	6.5	9.06
04	8.2	7.9
05	7.1	6.98
06	5.6	7.19
07	7.1	7.77
08	5.5	7.27
09	6.8	9.67
10	7.3	6.99

Tabela 9 - Quantificação de condrócitos (H&E) e colágeno (Picrosírius) na cartilagem articular de animais com RLCCr operados após 20 dias de lesão.

Casos	Condrócitos %	Colágeno []
01	3.5	1.3
02	3.4	0.7
03	2.3	1.5
04	3.9	2.3
05	2.5	0.9
06	3.2	2.0
07	3.7	1.3
08	4.1	2.7
09	4.8	3.2
10	4.2	1.95

Tabela 10 - Quantificação de condrócitos (H&E) e colágeno (Picrosírius) na cartilagem articular dos animais do grupo controle com osteoartrite

Casos	Condrócitos %	Colágeno []
01	7.5	6.9
02	7.2	5.61
03	7.8	5.08
04	6.5	6.0
05	6.0	5.64
06	9.0	5.63
07	8.5	5.27

Tabela 11 - Quantificação de condrócitos (H&E) e colágeno (Picrosírius) na cartilagem articular dos animais do grupo controle sem osteoartrite

Casos	Condrócitos %	Colágeno []
01	6.0	2.69
02	6.5	3.23
03	6.0	2.41
04	5.1	3.79
05	5.0	4.53
06	5.3	5.09
07	4.7	6.2

Tabela 12 - Celularidade do fluido sinovial do grupo de animais com RLCCr operados antes de 20 dias da lesão.

Casos	Leucócitos/ mm ³	Neutrófilos %	Mononuclear %
01	3800	3.3	96.7
02	6500	4.6	95.4
03	4300	5.8	94.2
04	4800	6.8	93.2
05	4500	8	92
06	950	4.9	95.1
07	850	4.2	95.8
08	1600	6.9	93.1
09	980	3.5	96.5
10	990	4.5	95.5

\

Tabela 13 - Celularidade do fluido sinovial do grupo de animais com RLCCr e operados após 20 dias da lesão

Casos	Leucócitos/ mm ³	Neutrófilos%	Mononuclear%
01	3200	3	97
02	2800	2.1	97.9
03	2900	3.8	96.2
04	3500	2.8	97.2
05	1500	3	97
06	4200	2.7	97.3
07	3400	4.6	95.4
08	2800	3.8	96.2
09	2400	4.7	95.3
10	3200	3	97

Tabela 14 - Celularidade do fluido sinovial de cães do grupo controle sem osteoartrite

Casos	Leucócitos/mm ³	Neutrófilos %	Mononuclear %
1	180	2	98
2	320	3	97
3	140	2	98
4	400	3.8	96.2
5	260	2	98
6	160	1.6	98.4
7	190	2.6	97.4
8	200	2	98
9	210	1.6	98.4
10	150	3.2	96.8
11	170	2.4	97.6
12	180	2	98
13	200	1.5	98.5
14	340	3	97
15	200	2.1	97.9
16	190	1.8	98.2
17	300	3.5	96.5
18	320	2.1	97.9
19	480	2.4	97.6
20	200	3	97

Quadro 3 - Escore semiquantitativo compreendidos em graus de 0 a 6, para análise das cartilagens coradas com Safranina-O/*fast-green*, que serviu para o estudo dos grupos operados com RLCCr, grupo normal de cartilagem e grupo com OA.

Grau - 0	- Apresenta morfologia da cartilagem intacta, arquitetura da matriz normal e orientação celular apropriada.
Grau -1	<p>* Grau 1.0 – células intactas.</p> <p>- Edema e/ou fibrilação superficial (abrasão); Conjuntos de proliferação celular.</p> <p>* Grau 1.5 – morte das células.</p> <p>- Condensação focal da matriz superficial; morte de células; hipertrofia da zona superficial.</p>
Grau -2	<p>* Grau 2.0 – fibrilação na zona superficial.</p> <p>- Maior descontinuidade da matriz na zona superficial (fibrilação profunda); - Leve coloração catiônica e depleção da matriz que reside em 1/3 da cartilagem;</p> <p>* Grau 2.5 - abrasão da superfície com perda da matriz dentro da zona superficial.</p> <p>- Leve coloração do pericôndrio aumentada (zona média); Leve desorientação de células das colunas dos condrócitos: morte e proliferação celular; clusters ; hipertrofia da matriz.</p>
Grau -3	<p>* Grau 3.0</p> <p>- Fissuras simples e verticais na zona média, ramificações da matriz; Leve depressão da coloração catiônica em 2/3 mais baixos da cartilagem (zona profunda);</p> <p>* Grau 3.5</p> <p>- Ramificado complexo de fissuras; morte celular; clusters em regeneração; hipertrofia; domínios da cartilagem junto as fissuras.</p>
Grau -4	<p>* Grau 4.0</p> <p>- Destruição da zona superficial; erosão; perda da matriz na cartilagem: destruição da camada superficial, formação de cistos da camada média.</p> <p>* Grau 4.5</p> <p>- Escavação da zona média; perda da camada superficial da matriz e da zona média.</p>
Grau -5	<p>* Grau 5.0 – superfície do osso intacta.</p> <p>- Desnudamento</p> <p>* Grau 5.5 – tecido reparativo presente na superfície.</p> <p>- Superfície: osso esclerótico ou tecido reparativo incluindo a fibrocartilagem dentro da superfície desnuda;</p> <p>- Microfratura com o reparo limitado para a superfície do osso.</p>
Grau -6	<p>* Grau 6.0 – migração de osteofitos marginais.</p> <p>- Deformação.</p> <p>* Grau 6.5 – migração de osteofitos marginais e centrais.</p> <p>- Remodelação do osso (não somente osteofitos); microfraturas com fibrocartilagem e reparo ósseo que estende acima da superfície precedente.</p>

Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007; 213: 626-34.
2. Seda H, Seda AC. Osteoartrite. In: Moreira C, Carvalho MA. *Reumatologia diagnóstico e tratamento.* 2a ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001. p.289-308.
3. Powers MY, Martinez SA, Lincoln JD, Temple AA. Prevalence of cranial cruciate ligament rupture in a population of dogs with lameness previously attributed to hip dysplasia: 369 cases (1994-2003). *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227:1109-11.
4. AmatuZZi MM. *Articulação central dos membros inferiores.* São Paulo: Roca; 2004. p.478.
5. Reife RA, Stuart JM, Hasty KA. Pathological cartilage degradation in human arthritides. In: Woessner, J.F., Howell, D.S., Marcel Dekker, *Joint cartilage degradation*, NY, 1995.

6. Fujita Y, Hara Y, Ochi H, Nezu Y, Harada Y, Yogo T, Orima H, Tagawa M. The possible role of the tibial plateau angle for the severity of osteoarthritis in dogs with cranial cruciate ligament rupture. *J Vet Med Sci.* 2006a;68:675-9.
7. Harasen G. Canine cranial cruciate ligament rupture in profile: (2002-2007) *Can Vet J.* 2008; 49(2):193-4.
8. Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. *Acta Orthoped Scand.* 1970;41:522-30.
9. Pond MJ, Nuki G. Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis.* 1973;32(4):387-8.
10. Biasi F, Rahal SC, Lopes RS, Volpi R S, Bergamo FMM. Alterações no líquido sinovial do joelho de cães com osteoartrite induzida pelo modelo Pond e Nuki. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001;53:34-48.

11. Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martins M, Backer J, Mayor MH, Frankel VH. Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum.* 1973;16:397-405.
12. Moskowitz RW, Kresina TF. Immunofluorescent analysis of experimental osteoarthritic cartilage and synovium: evidence for selective deposition of immunoglobulin and complement in cartilaginous tissues. *J Rheumatol.* 1986;2:391-6.
13. Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Mast W, Chase SW. Experimentally induced corticosteroid arthropathy. *Arthritis Rheum.* 1970; 13(3): 236-43.
14. Del Carlo RJ, Galvão MR, Vilorio MIV, Natali AJ, Barbosa ALT, Monteiro BS, Pinheiro LCP. Imobilização prolongada e remobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar de ratos: estudo clínico e microscópico. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2007;59(2):363-70.

15. Arnoczky SP. Pathomechanics of cruciate ligament and meniscal injuries. In: Bojrab MJ. *Disease mechanisms in small animal surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Lea; 1993. p.764-76.
16. Hegemann N, Kohnt B, Brunnberg L, Schmidt MF. Biomarkers of joint tissue metabolism in canine osteoarthritic and arthritic joint disorders. *Osteoarthritis Res Soc Int*. 2002;9:714-21.
17. Tartarunas AC, Matera JM, Franchini ML. Análise do líquido sinovial em cães: revisão literária. *Rev Edu Contin CRMV-SP*. 2004;7:7-14.
18. Hulse DA, Johnson AL. Artropatias. In: Fossum. *Cirurgia de pequenos animais*. 2a ed. São Paulo: Roca; 2005. p.1017-33.
19. Piermattei DL, Flo GH. Artrologia. In: Piermattei DL, Flo GH. *Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais*. 3^a ed. São Paulo: Manole; 1998. p.161.

20. Rooster H, Ryssen BV, Bree HV. Diagnosis of cranial cruciate ligament injury in dogs by tibial compression radiography. *Vet Res.* 1998;142:366-8.
21. Badoux DM. Biostática e biomecânica gerais. In: Getty R. *Anatomia dos animais domésticos*. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanara-Koogan; 1986. p.47-52.
22. Evans HE, Lahunta A. Sistema esquelético e muscular. In: Evans HE, Lahunta A. *Guia para a dissecação do cão*. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.28-49.
23. Comerford EJ, Tarlton JF, Innes JF, Johnson KA, Amis AA, Bailey JB. Metabolism and composition of the canine anterior cruciate ligament relate to differences in knee joint mechanics and predisposition to ligament rupture. *J Orthop.* 2005;23:61-6.
24. Nogueira SR, Tudury EA. Exame clínico ortopédico de cães e gatos. *Rev Clin Vet.* 2002;37:30-9.

25. Selmi AL, Padilha JGF, Lins BT, Mendes GM, Eimantas GC. O centro instantâneo de movimento e vetor velocidade em joelhos submetidos à incisuroplastia troclear e estabilização articular após transecção do ligamento cruzado cranial em cães. *Ciênc Rural*. 2007;37:777-83.
26. Barauna Jr D, Tudury EA. Uso do teste de compressão tibial e do deslocamento do sesamóide poplíteo no diagnóstico radiográfico da ruptura do ligamento cruzado cranial em cães. *Rev Port. Ciênc. Rural*. 2007;102: 71-4.
27. Narama I, Nishiyama MM, Matsuura T, Ozaki K, Nagatani M, Morishima T. Morphogenesis of degenerative changes predisposing dogs to rupture of the cranial cruciate ligament. *J Vet Med*. 1996;58:1091-7.
28. Arias AS, Rezende CMF, Melo EG, Nunes VA, Correa JC. Avaliação radiológica, artroscópica e histológica da membrana sinovial do joelho de cães tratados com associação de sulfato de condroitina e hialuronato de sódio, após doença articular induzida experimentalmente. *Arq Bras Med Vet. Zootec*. 2003; 55: 421-429.

29. Aaron RK, Skonick AH, Reiner TSE, Ciombor DM. Arthroscopic débridement for osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88:936-43.
30. Boulocher C, Chereul E, Langlois JB, Armenean M, Duclos ME, Viguier E, Roger T, Vignon E. Non-invasive in vivo quantification of the medial tibial cartilage thickness progression in an osteoarthritis rabbit model with quantitative 3D high resolution micro-MRI. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15:1378-87.
31. Fitch RB, Montgomery RD, Garrett PD, Kincaid SA, Wright JC, Terry GC. The intercondylar fossa of the normal canine stifle: an anatomic and radiographic study. *Vet Sug.* 1995;24:148-55.
32. Rendano-Jr VT, Shoup CL. Radiological diagnosis of canine osteoarthritis. In: Management of Canine Osteoarthritis. A Pfizer Symposium held in conjunction with the XXIII Cong. W. S. An. Vet. As. Buenos Aires; 1998. p.27-30.

33. Innes JF, Barr ARS, Sharif M. Efficacy of oral calcium pentosan polysulphate for the treatment of osteoarthritis of the canine stifle joint secondary to cranial cruciate ligament deficiency. *Vet Rec.* 2000;146:433-7.
34. Shahar R, Milgram J. Biomechanics of tibial plateau leveling of the canine cruciate-deficient stifle joint: a theoretical model. *Vet Surg.* 2006;35:144-9.
35. Chierichetti AL, Alvarenga J, Pedro CR, Stopliglia AJ. Ruptura de ligamento cruzado cranial. Estudo comparativo da técnica extra-articular com enxerto autógeno de fáscia lata com e sem artrotomia exploratória. *Rev Clín Vet.* 2001;6:33-42.
36. Buquera LEC, Filho JGP, Canola JC, Talieri IC, Furlani JM. Estabilização extra-articular do joelho com fascia lata autógena em cães de raças de grande porte. *Arq Bras Med Ve. Zootec.* 2007;59:42-54.
37. Troyer H. Experimental models of osteoarthritis: a review. *Semin Arthritis Rheum.* 1982;11:362-74.

38. Hough AJ Jr. Pathology of osteoarthritis. In: McCarty DJ. *Arthritis and allied conditions*. A textbook of rheumatology. Philadelphia: Lea-Febriger; 1993. p.1699-721.
39. Fuller R, Hirose-pastor E. Osteoartrose. In: Yoshinany NH, Bonfá EDO. *Reumatologia para o clínico*. São Paulo: Roca; 2000. p.139-48.
40. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
41. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner F. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthrotic cartilage. *J Clin Invest*. 1989;84:678-85.
42. Fernandez FR, Grindem CB, Lipowitz AJ, Perman V. Synovial fluid analysis: preparation of smears for cytologic examination of canine synovial fluid. *J Am Vet Hosp Assoc*. 1983;10:727-34

43. Bruin T, Rooster H, Bree VE. Interleukin-8 mRNA expression in synovial fluid of canine stifle joints with OA. *Vet Immunol. Immunopathol.* 2005;108:387-97.
44. Fujita Y, Hara Y, Yamaguchi S, Schulz KD, Tagawa M. Direct and indirect markers of cartilage metabolism in synovial fluid obtained from dogs with hip dysplasia and correlation with clinical and radiographic variables. *Am J Vet Res.* 2005;66:2028-33.
45. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Lascau CV, Moldovam F, Jovanovic D, Raynauld JP, Pelletier JP. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol.* 1998;25:1585-
46. Mello SBV, Laurindo IMM. A resposta inflamatória. In: Yoshinary NH, Bonfá EDO. *Reumatologia para o clínico*. São Paulo: Roca; 2000. p.1-9.
47. Velosa APP, Teodoro WR, Yoshinari NH. Colágeno na cartilagem osteoartrósica. *Rev Bras Reumatol.* 2003;43:160-6.

48. Pelletier JP, Boileau C, Boily M, Brunet J, Mineau F, Geng C, Reboul P, Laufer S, Lajeunesse D, Martel-Pelletier J. The protective effect of licofelone on experimental osteoarthritis is correlated with the down regulation of gene expression and protein synthesis of several major cartilage catabolic factors: MMP-13, cathepsin K and aggrecanases. *Arthritis Res.* 2005;7:1091-102.
49. Perman V. Synovial fluid. In: Kaneko J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 3th ed. New York: Academic Press; 1980. p.749-83.
50. Ellison RS. The cytologic examination of synovial fluid. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1988;3:133-9.
51. McWilliams PS, Friedrichs KR. Laboratory evaluation and interpretation of synovial fluid. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003;33:153-78.
52. Tudury EA, Raiser AG. Redução de fraturas distais do fêmur de cães, empregando dois pinos de Steinmann em substituição aos de Rush. *Rev Centro Ciências Rurais*. 1985;173:1817-65.

53. Constantinescu GM. A cabeça. In. Constantinescu GM. *Anatomia clínica de pequenos animais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005a. p.64-132.
54. Velosa APP, Teodoro WR, Witzel SS, Yoshinari NH. Quantificação do colágeno XI em cartilagem articular de coelhos com osteoartrose. *Rev Bras Reumatol*. 1999;39:137-42.
55. Gundersen HJG, Bendetsen F, Jorbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsom et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96:379-94.
56. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14:13-29.
57. Schader SC, Prieur WD, Bruse S. Diagnosis: historical, physical and ancillary examinations. In: Olmstead ML. *Small animal orthopedics*. Ohio: Mosby; 1995. p.3-26.

58. Bennet D, May C. Moléstias articulares de case e gatos. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *Tratado de medicina interna veterinária*. 4^a ed. São Paulo: Manole; 1997. p.2805-66.
59. Altman RD, Gray RG. Laboratory findings in osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Goldeberg VM. *Osteoarthritis: diagnosis and management*. Philadelphia: W B Saunders; 1984. p.185-97.
60. Parry BW. Miscellaneous laboratory techniques. In: Pratt PW. *Laboratory procedures for veterinary technicians*. Ohio: Mosby; 1996. p.561-626.
61. Morris E, Lipowitz AJ. Comparison of tibial plateau angles in dogs with and without cranial cruciate ligament injuries. *J Am Vet Med Assoc*. 2001;218:363-6.
62. Lipowitz AJ. Degenerative joint disease. In: Slatter D. *Textbook of small animal surgery*. 2^a ed. Philadelphia: W B Saunders; 1993. v. 2., p.1921-7.

63. Vasseur PB, Pool RR, Arnoczky SP, Lau RE. Correlative biomechanical and histologic study of the cranial cruciate ligament in dogs. *Am J Vet Res.* 1985;9:1842-54.
64. Aiken SW, Kass PH, Toombs JP. Intercondylar notch width and without cranial cruciate ligament injuries. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 1995;3:128-32.
65. Constantinescu GM. O Membro pélvico. In. Constantinescu GM. *Anatomia clínica de pequenos animais.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan: 2005b. p. 295-332.
66. Rayward RM, Thomson DG, Davies JV, Innes JF, Whitelock RG. Progression of osteoarthritis following TPLO surgery: a prospective radiographic study of 40 dogs. *J Small Anim Pract.* 2004;45:92-7.
67. Biasi F, Rahal SC, Volpi RS, Sequeira JL. Reconstrução do ligamento cruzado cranial em cães, associado ou não ao sulfato de condroitina. *Arq.Bras Med Vet Zootec.* 2005;57:45-53.

68. Dupuis J, Harari J. Cruciate ligament and meniscal injuries in dogs. *Continued Educ Pract Vet.* 1993;15:215-21.
69. Echigo R, Machizuki M, Nishimura R, Sasaki N. Suppressive effect of hyaluronan on chondrocyte apoptosis in experimentally induced acute osteoarthritis in dogs. *J Vet Med Sci.* 2006;68:899-902.
70. Burgeson RE, Hollister DW. Collagen heterogeneity in human cartilage: identification of several new collagen chains. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979;87:1124-31.
71. Egri D, Battistella LR, Yoshinari NH. O envelhecimento da cartilagem articular. *Rev Bras Reumatol.* 1999;39:45-8.
72. Takahashi B, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D. The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1 β (IL-1 β), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999;7:182-90.

73. Maiotti M, Monteleone G, Tarantino U, Fasciglione GF, Marini S, Coletta M. Correlation between osteoarthritic cartilage damage and levels of proteinases and proteinase inhibitors in synovial fluid from knee joint. *Arthroscopy*. 2000;16:522-6.
74. Young AA, Smith MM, Smith SM, Cake MA, Ghosh P, Read RA, Melrose J, Sonnabend DH, Roughley PJ, Little CB. Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:852-61.
75. Kreuz PC, Steinwachs M, Erggelet C, Krause SJ, Ossendorf C, Maier D, Ghanem N, Uhl M, Haag M. Classification of graft hypertrophy after autologous chondrocyte implantation of full-thickness chondral defects in the knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:1339-47.
76. Jones CW, Smolinski D, Willers C, Yates PJ, Keogh A, Fick D, Kirk TB, Zheng MH. Laser scanning confocal arthroscopy of a fresh cadaveric knee joint. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;5:1388-96.
77. Clements DN, Carter SD, Innes JF, Ollierwer DPJ. Analysis of normal and osteoarthritic. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:158-64.

78. Yeh T, Wu SS, Lee CH, Wen ZH, Lee HS, Yang Z, Nimni ME, Han B. The short-term therapeutic affect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on collagenase-induced lumbar facet joint osteoarthritis in rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:1357-66.
79. Taylor RA. Treatment methodologies. In: Bloomberg MS, Dee FJ, Taylor RA. Canine sports medicine and surgery. Philadelphia: W B Saunders; 1998. p.265-74.
80. Borges APB, Rezende CMF, Assis CB, Perreira MF, Andrade LM. Composição do líquido sinovial de cães com ruptura de ligamento cruzado cranial. *Ciênc Rural*. 1999;29:57-65.
81. Silva Jr FS, Yoshinari NH, Castro RR, Girão VCC, et al. Combined glucosamine and chondroitin sulfato provides functional and strutural benefit in the anterior cruciate ligament transection model. *Clin Reumatol*. 2008; 28(2):109-17

82. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Imunobiologia: o sistema immune na saúde e na doença*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. p.767.
83. Kyriakides TR, Foster MJ, Keeney GE, Tsai A, Giachelli CM, Clark-Lewis I, Rollins BJ, Bornstein P. The CC chemokine ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation. *Am J Pathol*. 2004;165:2157-66.
84. Dankbar B, Neugebauer K, Wunrau C, Tibesku CO, Skwara A, Pap T, Fuchs-Winkelmann S. Hepatocyte growth factor induction of macrophage chemoattractant protein-1 and osteophyte-inducing factors in osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2007;25:569-77.
85. Fujita Y, Hara Y, Nezu Y, Schulz KS, Togawa M. Proinflammatory cytokine activities, matrix metalloproteinase-3 activity, and sulfated glycosaminoglycan content in synovial fluid of dogs with naturally acquired cranial cruciate ligament rupture. *Vet Surg*. 2006b;35:369-76

86. Perlman H, Bradley K, Liu H, Cole S, Shamiyeh E, Smith RC, Walsh K, Fiore S, Koch AE, Firestein GS, Haines GK 3rd, Pope RM. IL-6 and Matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor P-21 in synovial fibroblasts. *J Immunol.* 2003;170:838-45.
87. Hegemann N, Wondimu A, Kohn BBL, Schmidt MFG. Cytokine profile in canine immune-mediated polyarthritis and osteoarthritis. *Vet Comp Orthop. Traumatol.* 2005;18:67-72.
88. McNearney T, Baethge BA, Cao S, Alam R, Lisse Jr, Westlund KN. Excitatory aminoacids, TNF- α , and chemokine levels in synovial fluid of patients with active arthropathies. *Clin Exp Immunol.* 2004;137:621-7.