UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RENAN GRIGOLETTO

**EFEITO TERAPÊUTICO DO PENTOSAN POLISULFATADO SÓDICO A OSTEOARTRITE
DE EQUINOS**

Pirassununga
2020

RENAN GRIGOLETTO

**EFEITO TERAPÊUTICO DO PENTOSAN POLISULFATADO SÓDICO SOBRE A OSTEO-
ARTRITE DE EQUINOS**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Prevenção, Diagnóstico e Terapias Inovadoras

Orientador: Profa. Dra. Renata Gebara Sampaio Dória

Pirassununga

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G393e Grigoletto, Renan
EFEITO TERAPÊUTICO DO PENTOSAN POLISULFATADO
SÓDICO SOBRE A OSTEOARTRITE DE EQUINOS / Renan
Grigoletto ; orientador Renata Gebara Sampaio
Doria . -- Pirassununga, 2020.
81 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. amiloide sérico A. 2. cavalos. 3. doenças
articulares. 4. pentosan. 5. líquido sinovial. I.
Gebara Sampaio Doria , Renata , orient. II. Título.

RESUMO

GRIGOLETTO, R. Efeito terapêutico do pentosan polisulfatado sódico sobre a osteoartrite de equinos. 80f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

A deterioração progressiva e perda da cartilagem articular são os eventos finais da osteoartrite (OA) em equinos, causando dor e comprometendo o desempenho atlético. A grande incidência da osteoartrite em equinos justifica a realização de pesquisas envolvendo novas técnicas terapêuticas para doenças articulares. Para isso, esse estudo teve como objetivo avaliar comparativamente o tratamento da OA em equinos com Fenilbutazona, via intravenoso (IV) ou Pentosan Polisulfatado Sódio (PPS), via intra-articular (IA). Foram utilizados dez equinos, com idade média de 13,4 anos e diagnosticados com OA por avaliação radiográfica, os quais foram submetidos a administração de fenilbutazona intravenosa, durante cinco dias (Tratamento 1), seguido de um período de *washout* de 7 dias e administração IA de Pentosan Polisulfatado Sódio (PPS), a cada sete dias, em um total de quatro aplicações (T0, T7, T14, T21; Tratamento 2). Foram realizados exames de claudicação, grau de efusão sinovial, inspeção visual e avaliação em líquido sinovial da articulação envolvida quanto à concentração da citocina IL-6 e da proteína de fase aguda amiloide sérico A antes do início do experimento (D0) e após tratamento com fenilbutazona (D5), antes do início da administração de PPS IA (T0) e a cada sete dias (T7, T14, T21, T28) e após 30 e 60 dias (T30 e T60). Foi realizado exame hematológico, bioquímica sérica (função hepática e renal) e avaliação bioquímica e citológica de líquido sinovial antes do início do tratamento 2 (T0) e após a última administração IA de PPS (T28), a fim de avaliar alterações sistêmicas e ou locais que a administração de PPS IA poderia causar. Foi observado menor grau de claudicação quando os animais receberam PPS IA, em relação a quando os animais foram tratados com fenilbutazona IV, assim como as concentrações de IL-6 e ASA foram menores no tratamento 2 ($p < 0.05$). A administração repetida de PPS IA promoveu aumento da efusão sinovial, de maneira reversível e elevação da celularidade sinovial, sem alterações hematológicas ou de função hepática e renal. Conclui-se que o PPS administrado por via intra-articular em equinos, auxilia os animais acometidos por osteoartrite, reduzindo dor e inflamação sinovial, sem efeitos indesejáveis sistêmicos.

Palavras-chave: amiloide sérico A, cavalos, doenças articulares, pentosan, líquido sinovial.

ABSTRACT

GRIGOLETTO, R. Therapeutic effect of sodium polysulfated pentosan on equine osteoarthritis. 80f. PhD Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

Progressive deterioration and loss of articular cartilage are the final events of osteoarthritis (OA) in horses, causing pain and impairing athletic performance. The high incidence of osteoarthritis in horses justifies conducting research involving new therapeutic techniques for articular diseases. Therefore, this study aimed to evaluate comparatively the treatment of OA in horses with intravenous (IV) phenylbutazone or Pentosan polysulfated sodium (PPS) by intra-articular (IA). Ten horses, with an average age of 13.4 years and diagnosed with OA by radiographic evaluation, were submitted to intravenous phenylbutazone for five days (Treatment 1) followed by a washout period of 7 days and IA administration of Pentosan Polysulfated Sodium (PPS) every seven days for a total of four applications (T0, T7, T14, T21; Treatment 2). Lameness, synovial effusion, visual inspection, and synovial fluid assessment of the involved articular were performed for the concentration of IL-6 cytokine and serum acute amyloid protein A. The experimental period was conducted before the initial of experiment (D0) and after phenylbutazone treatment (D5), also before PPS IA (T0) administration and every seven days (T7, T14, T21, T28) and after 30 and 60 days (T30 and T60). Hematological examination, serum biochemistry (liver and renal function), biochemical and cytological evaluation of synovial fluid were performed before initiation of treatment 2 (T0) and after the last PPS IA administration (T28) to assess systemic changes and/or sites that administration of PPS IA could cause. Lower lameness was observed when animals received PPS IA compared to when animals were treated with phenylbutazone IV as well as IL-6 and serum amyloid A (SAA) concentrations were lower in treatment 2 ($p < 0.05$). Repeated administration of PPS IA promoted a reversible increase in synovial effusion and elevation of synovial cellularity, without hematological or hepatic and renal function changes. It can be concluded that intra-articular PPS administered to horses helps animals with osteoarthritis, reducing pain and synovial inflammation without systemic undesirable effects.

Key-words: articular diseases, horses, pentosan, serum amyloid A, synovial fluid

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1. Imagens das instalações utilizadas para o desenvolvimento do presente estudo. A. pavilhão 1 das cocheiras; B. cocheiras de alojamento; C. tronco de contenção; D. pavilhão 2 das cocheiras.</u>	<u>26</u>
<u>Figura 2. Figura dos animais.....</u>	<u>28</u>
<u>Figura 3. Esquema delineamento experimental.....</u>	<u>29</u>
<u>Figura 4. Ilustração dos posicionamentos de filmagem</u>	<u>30</u>
<u>Figura 5. Gráfico das avaliações do exame locomotor.</u>	<u>40</u>
<u>Figura 6. Gráfico das circunferências articulares.....</u>	<u>42</u>
<u>Figura 7. Gráfico da inspeção visual do LS.</u>	<u>44</u>
<u>Figura 8. Gráfico com a concentração média de IL-6 entre os animais nos diferentes tempos.....</u>	<u>46</u>
<u>Figura 9. Gráfico com a concentração média de ASA entre os animais nos diferentes tempos.....</u>	<u>49</u>
<u>Figura 10. Gráfico da concentração média de ASA entre os tempos</u>	<u>50</u>
<u>Figura 11. Gráfico dos animais nos tempos e tratamentos com flexão</u>	<u>70</u>
<u>Figura 12. Gráfico da normalidade dos dados após os tratamentos com flexão</u>	<u>71</u>
<u>Figura 13. Gráfico dos animais nos tempos e tratamentos sem flexão</u>	<u>71</u>
<u>Figura 14. Gráfico da normalidade dos dados após os tratamentos sem flexão</u>	<u>72</u>
<u>Figura 15. Gráfico da média entre IL-6 x ASA x Claudicação.....</u>	<u>80</u>
<u>Figura 16. Gráfico da concentração média de IL-6 (pg/ml).....</u>	<u>80</u>
<u>Figura 17. Gráfico da concentração de ASA x IL-6 entre os tempos experimentais.....</u>	<u>81</u>
<u>Figura 18. Gráfico da avaliação citológico do líquido sinovial.....</u>	<u>81</u>

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1. Descrição do grau de claudicação e escore de acordo com o teste de flexão.</u>	31
<u>Tabela 2. Classificação de efusão articular.</u>	32
<u>Tabela 3. Ficha de avaliação radiográfica</u>	33
<u>Tabela 4. Correlação entre os escores atribuídos pelos avaliadores</u>	41
<u>Tabela 5. Média entre os tempos da avaliação Citológica do LS</u>	44
<u>Tabela 6. Concentração média de IL-6 entre os tempos e tratamentos</u>	45
<u>Tabela 7. Diferença da concentração de IL-6 entre os tempos dos tratamento.</u>	47
<u>Tabela 8. ANOVA entre os tempos, considerando todos os tempos.</u>	47
<u>Tabela 9. ANOVA entre os tempos, considerando dois tratamentos unindo D0 e D5 e todos os Ts (T0, T7, T14, T21, T28, T30 e T60).</u>	47
<u>Tabela 10. Diferença entre as concentrações de ASA nos tempos experimentais</u> ...	48
<u>Tabela 11. ANOVA entre os tempos, considerando todos os tempos.</u>	48
<u>Tabela 12. ANOVA entre os tempos, considerando dois tratamentos unindo D0 e D5 e todos os Ts (T0, T7, T14, T21, T28, T30 e T60).</u>	49
<u>Tabela 13. Concentração média entre os tempos e tratamentos para as concentrações de ASA.</u>	51
<u>Tabela 14. Tabela. Análise estatística entre os tratamentos</u>	72
<u>Tabela 15. Tabela ANOVA para os testes de claudicação pós flexão e sem flexão* Considerando p-valor 0.05 como limiar significativo.</u>	72
<u>Tabela 16. Avaliação passo avaliadores</u>	77

LISTA DE SIGLAS

OA	Osteoartrite
PPS	Pentosano Polissulfatado Sódico
ASA	Amilóide Sérico A
GAGS	Glicosaminoglicanas
AH	Ácido Hialurônico
MMP	Metaloproteinases da Matriz
LS	Líquido Sinovial
IL-6	Interleucina -6
IL-1	Interleucina -1
kDa	Kilo Daltons
TNF- α	Tumoral Necrosis Factor - alpha
PGE ₂	Prostaglandina E2
COX-2	Cicloxigenase -2
TIMP	Metalloproteinase Inhibitor - 1
PTG	Proteoglicanos
LP	Link Protein
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ANOVA	Análise de variância
ADAMTS	Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin
MEC	Matriz Extracelular
MPS	Mucopolissacaridose

SUMARIO

Table of Contents

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. HIPOTESE E OBJETIVOS.....	12
2.1. Hipótese.....	12
2.2. Objetivos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. Osteoartrite	13
3.2. Cartilagem hialina	16
3.3. Diagnóstico.....	17
4. LÍQUIDO SINOVIAL	19
4.1. Análise do líquido sinovial.....	19
5. PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS DE FASE AGUDA	19
5.1. Desencadeamento da resposta de fase aguda	20
5.2. Classificação das proteínas de fase aguda.....	21
6. Interleucina 6 (IL-6) e degradação da cartilagem articular.....	22
7. AMILÓIDE SÉRICO A.....	23
8. PENTOSAN POLISULFATADO SÓDICO.....	24
8.1. Pentosan polisulfatado sódico	24
8.2. Doses e vias de administração do PPS	26
9. MATERIAL E Métodos	28
9.1. Animais experimentais	28
9.2. Delineamento experimental.....	29
9.3. Avaliação da claudicação e respostas aos testes de flexão	31
9.4. Avaliação da efusão sinovial.....	34
9.5. Estudo radiológico.....	34
9.5.1. Avaliação hematológica e bioquímica sérica.....	38
9.6. Colheita do líquido sinovial	38
9.6.1. Avaliação laboratorial do líquido sinovial.....	39
9.6.3. Interleucina - 6	41
9.6.4. Amilóide sérico A	42
10. RESULTADOS.....	43
10.1. Exame Físico	43
10.2. Exame Radiográfico.....	44
10.3. Efusão Articular.....	45

10.4.	Exames Hematológicos.....	46
10.6.	Interleucina-6.....	48
10.4.	Amilóide Sérico A (ASA)	52
REFERENCIAS.....		67
APENDICE A		78

1. INTRODUÇÃO

Osteoartrite (OA) em equinos muitas vezes resulta em aposentadoria precoce de uma carreira atlética ou da cavalgada prazeroso (GOODRICH & NIXON, 2006; FERRIS et al., 2011; MCILWRAITH, FRISBIE & KAWCAK, 2011; BROECKX et al., 2019). A osteoartrite é caracterizada pela degeneração da articulação sinovial, abrangendo diferentes graus de lesão na cartilagem articular, alterações na proliferação óssea, esclerose subcondral e disfunções na membrana sinovial (KIDD et al., 2001; CARON, 2003; KRAMER et al., 2014).

A OA incipiente, tem como primeiros sinais, antes do aparecimento da degradação da cartilagem macroscopicamente visível, o amolecimento do tecido, que é atribuível principalmente à deterioração da matriz fundamental, principalmente pela depleção de colágeno e proteoglicanos (AROKOSKI et al., 2000; BROMMER et al., 2004a; VAN WEEREN et al., 2008). Embora a fragmentação osteocondral, as fraturas, a doença óssea subcondral, a osteoartrite e a osteoartrite dissecante (OCD) sejam comuns no cavalo, essas doenças são diagnosticadas normalmente apenas após o seu estabelecimento (ARICAN et al., 2019). A detecção das doenças em estágio inicial ou sutis era ruim, mas a situação está melhorando, o exame clínico e a imagem radiográfica ainda são técnicas mais usadas para o diagnóstico da doença osteocondral, mas o dano osteocondral causado, durante o exame artroscópio é geralmente mais grave do que o observado nas radiografias (BROMMER et al., 2003b; ARICAN et al., 2019).

Nos últimos anos, vários medicamentos foram avaliados e/ou utilizados para o tratamento de cavalos com OA, incluindo os anti-inflamatórios não esteroidais, corticosteróides, glicosaminoglicanos polissulfatados (PSGAG) e ácido hialurônico (MCILWRAITH & TROTTER, 1996; FRISBIE, et al., 2006; MCILWRAITH et al., 2012). E também o hidrogel de poliacrilamida (PAHG), que são frequentemente utilizados e associados com o efeito anti-inflamatório, proteção osteocondral e regeneração, melhora da viscosidade e da mobilidade articular (TNIBAR et al., 2015; FRISBIE et al., 2016; SOUZA, PARETSIS & ZOPPA, 2020).

Em busca de diagnósticos e tratamentos alternativos, existe um interesse crescente em tentar mensurar esse remodelamento e eventos patológicos *in vivo* (POOLE, 2002). Com a descoberta de que muitas das moléculas da matriz ou os produtos da degradação dessas moléculas são liberados e podem ser detectados bioquimicamente e imunologicamente nos fluídos corporais (POOLE, 2000; 2002), estudos vem sendo realizados de modo a identificar se esses biomarcadores nos fluídos corporais refletem ou predizem processos moleculares, já que sua concentração se altera com a degeneração articular e remodelação do osso, associado com o início da OA (POOLE, 2000). Desse modo, a proteína de fase aguda, amilóide sérico A (ASA) pode ser considerada como biomarcador por ser sintetizada primariamente no fígado em resposta a processos inflamatórios e infecciosos (JACOBSEN et al., 2006). Atualmente, estudos envolvendo o ASA, quanto a sua resposta em doenças articulares, são limitados. Entretanto, sabe-se que a concentração de ASA se eleva no plasma, assim como no líquido sinovial, após artrite induzida experimentalmente (HULTÉN et al., 2002; JACOBSEN et al., 2006).

Recentemente, o Pentosan Polisulfatado Sódico (PPS) têm sido utilizado por via intramuscular em doenças articulares de equinos (MCILWRAITH et al., 2012), bem como, por via intra-articular (KWAN et al., 2012). O PPS, é um polissacarídeo polisulfatado semi-sintético derivado da hemicelulose da árvore *beech wood* (GHOSH, 1999). Também, em doença articular induzida, em coelhos, a administração oral de PPS, manteve os níveis normais de agrecan na cartilagem articular (SMITH et al., 1994). O PPS também estimulou a síntese de hialuronato em cultura de sinoviócitos obtida por meio de articulações reumáticas e osteoartríticas (JIMENEZ. 1996). Também foi demonstrado efeito anti-artrítico em um estudo conduzido em rato, onde o PPS suprimiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias, marcadores de osteoclastos e concentração de biomarcadores de artrite (SURANJI WIJEKOON et al., 2019) Com este estudo, buscou-se demonstrar o efeito terapêutico do PPS em equinos com osteoartrite, comparando os resultados com o tratamento convencional com anti-inflamatório não esteroide.

2. HIPOTESE E OBJETIVOS

2.1. Hipótese

A administração intra-articular do Pentosan Polisulfatado Sódio (PPS) é capaz de reduzir a dor e a inflamação articular em equinos com osteoartrite.

2.2. Objetivos

- Avaliar comparativamente os efeitos terapêuticos da fenilbutazona, administrada pela via intravenosa e do Pentosan Polisulfatado Sódio (PPS), administrado pela via intra-articular em equinos com osteoartrite;
- Avaliar comparativamente as concentrações da citocina Interleucina (IL-6) e da proteína de fase aguda, Amilóide Sérico A (ASA) em equinos com osteoartrite tratados com fenilbutazona, administrada pela via intravenosa e com Pentosan Polisulfatado Sódio (PPS), administrado pela via intra-articular.
- Avaliar se a administração intra-articular do Pentosan Polisulfatado Sódio (PPS) é segura para equinos com osteoartrite.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Osteoartrite

Distúrbios na homeostase articular que não podem ser mantidos dentro de limites fisiológicos causam um desequilíbrio entre processos catabólicos e anabólicos e podem levar ao aparecimento de distúrbios articulares, como as osteoartrites (OA) (GOLDRIN & MARCU, 2009; de GRAUW, 2011; CHU, 2015; te MOLLER et al., 2019).

As OAs podem ser classificadas, segundo Mcilwraith (2003), em quatro tipos:

Tipo 1: Aguda: frequentemente associada à sinovite e a capsulite. Afeta mais as articulações com elevada mobilidade, exemplo: boleto.

Tipo 2: Insidiosa: envolve as articulações com baixa mobilidade, como as interfalangeanas.

Tipo 3: Incidental não progressiva: A erosão da cartilagem articular é um achado na artroscopia ou necropsia.

Tipo 4: Engloba a osteoartrite secundária e processos articulares primários (fraturas intra-articulares, osteocondroses, patologias ou lesões do osso subcondral, artrite infecciosa, lesão nos ligamentos).

A etiopatogenia da OA ainda não está totalmente esclarecida, três mecanismos foram propostos. O primeiro envolve uma cartilagem deficiente com propriedades biomecânicas anormais. A segunda baseia-se em alterações físicas no osso subcondral decorrentes da cartilagem articular apresenta-se bastante delgada para absorver choques, sendo a carga de impacto atenuada somente pelos tecidos moles periarticulares, músculos, osso subcondral e osso trabecular fiseal (CARON, 2003).

A terceira e mais popular, baseia-se na atuação de forças mecânicas causando danos à cartilagem articular saudável. Considera-se que a injúria matricial ou celular, resultante dessas forças, cause alterações metabólicas sob os condrócitos, levando a liberação de enzimas proteolíticas que causam fibrilação da cartilagem articular e degradação das proteoglicanas (CARON, 2003). Micro traumas repetitivos são pro-

vavelmente os fatores etiológicos mais comuns nas osteoartrites em equinos e a relação com as lesões são definidas em situações específicas do esporte (CHARLOTTE et al., 1999; MAGNUSSON et al., 2001; RIGGS, 2006; CARON, 2011).

A articulação mais frequentemente afetada pela osteoartrite em equinos atletas é a articulação metacarpofalangeana (CHARLOTTE et al., 1999). Em uma tentativa de resumir o processo de deterioração articular, define-se este como decorrente do uso excessivo da articulação ou decorrente a conformações inadequadas que predis põem o cavalo às forças biomecânicas indesejadas sobre a cartilagem. O processo inflamatório se inicia na sinóvia, cápsula articular ou osso subcondral e rapidamente desencadeia uma cascata de mediadores inflamatórios. Levando a um efeito dominó em outros tecidos articulares que no que lhe concerne também liberam mediadores inflamatórios (GOODRICH et al., 2006).

Numa articulação normal os condrócitos são responsáveis por manter o balanço entre a degradação da matriz cartilágnea e sua reparação, e esse equilíbrio é mantido pela interação complexa entre condrócitos, citocinas e estímulos mecânicos. Nas osteoartrites ocorre a quebra desta condição de homeostase, o que leva a um processo catabólico predominante (CARON, 2003; RIGGS, 2006).

Numerosas citocinas estão envolvidas no metabolismo articular, sendo que as mais importantes nas osteoartrites são as citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (CARON, 2003; KIDD et al., 2001; RIGGS, 2006).

Os receptores de condrócitos para a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral alfa são rigorosamente regulados na cartilagem, sendo que sua ativação causa vários efeitos deletérios no metabolismo dos condrócitos. Na doença articular a IL-1 β e o TNF- α mediadores inflamatórios estimulam os hepatócitos estimulando a expressão do gene celular para a produção de proteínas de fase aguda (SMIT et al., 2019), esses mediadores também induzem a liberação de metaloproteinases da matriz cartilágnea que destroem a cartilagem articular, estimulam fibroblastos a produzir colágeno tipo 1 e tipo 3 que contribuem para a fibrose da cápsula articular na inflamação crônica (KIDD et al., 2001). Também diminui a síntese de proteoglicanas e de colágeno tipo 2 (CARON, 2003).

A prostaglandina (PGE_2) é um mediador inflamatório de marcante atuação nas OAs, e provavelmente a enzima COX-2 seja a principal responsável pelo seu aumento local durante o processo inflamatório de tecidos sinoviais, devido a sua atuação no controle de produção dos eicosanóides. A PGE_2 encontra-se em elevadas concentrações nas articulações inflamadas e podem contribuir para a depleção de matriz extracelular causando erosão na cartilagem e no osso subcondral (CARON, 2003). As ações da prostaglandina incluem vasodilatação, aumento da percepção de dor, depleção de proteoglicanas da cartilagem, desmineralização óssea e promoção da secreção de ativadores de plasminogênio (MCILWRAITH, 1996). Há também evidências de que a membrana sinovial e a cápsula articular fibrosas inflamadas sejam fontes de enzimas lisossomais degenerativas. Além das enzimas lisossomais e das prostaglandinas, outros mecanismos podem estar envolvidos na degeneração da cartilagem articular, como o radical peróxido. O radical peróxido tem capacidade de degradar os proteoglicanos, o colágeno da cartilagem articular e o ácido hialurônico (MCILWRAITH, 2002).

As metaloproteinases (MMPs) são as principais responsáveis pela degradação da matriz cartilágnea nas OAs, pois, são capazes de digerir todos os principais componentes da matriz extracelular. As MMPs são sintetizadas pelos sinoviócitos e condrócitos, e estão presentes em altas concentrações em doenças da cartilagem, sendo sua distribuição topográfica e concentrações correlacionadas com a severidade das lesões histopatológicas (CARON, 2003).

Na osteoartrite, estas se encontram em níveis elevados promovendo a produção de óxido nítrico, metaloproteinases e a prostaglandina E, e inibindo a síntese de agrecan e colágeno tipo II (AUER & STICK, 2012). A MMP-1 é capaz de quebrar as moléculas de colágeno tipo II, principal componente da cartilagem articular (MCILWRAITH, 2005).

As atividades da matriz também são reguladas pela ativação dos zimógenos precursores e inibição por inibidores endógenos, inibidores de metaloproteinases (TIMPs). Assim, o equilíbrio entre MMPs e TIMPs é crítico para a eventual remodelação da matriz extracelular (MEC) no tecido (NAGASE VISSE & MURPHY, 2006). Os TIMPs são reduzidos na OA, mucopolissacaridose (MPS) e outras doenças ósseas

inflamatórias, resultando em atividades elevadas de MMPs e agrecanases degradantes da matriz (SIMONARO et al., 2010; FOTOPOULOS et al., 2012). Foi demonstrado que o PPS aumenta a afinidade entre pelo menos uma agrecanase A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin – 5 (ADAMTS-5) e inibidor tecidual de metaloproteinase - 3 (TIMP-3) in vitro (TROEBERG et al., 2012), resultando em atividade reduzida da agrecanase (SCHUCHMAN et al., 2013). Estudos anteriores em animais do mesmo grupo também mostraram que a PPS elevou os níveis de TIMPs de cartilagem, levando a níveis reduzidos de ADAMTS-4 e 5 (TROEBERG et al., 2008; SCHUCHMAN et al., 2013).

As MMPs são secretadas como pró-enzimas latentes e ativadas extracelularmente. Provavelmente a collagenase é ativada pela estromelisina, porém, tanto a collagenase como outras MMPs podem ser ativadas pela plasmina, calicreína e catepsina B, já a estromelisina é ativada tanto pela plasmina como por outras proteases que ativam a collagenase (MCILWRAITH, 1996). A MMP-1 (collagenase) e a MMP-3 (estromelisina ou proteoglicanase neutra) apresentam importância, uma vez que na degradação da matriz, é comprovado suas elevadas atividades tanto na cartilagem, nas membranas sinoviais de pacientes com osteoartrite, e na membrana sinovial reumatóide em humanos (MCILWRAITH, 1996). MMPs são inibidas por dois inibidores de metaloproteinases teciduais (Metalloproteinase Inhibitor – 1 TIMP-1-2), TIMP-1 E TIMP-2. Uma deficiência de TIMP em relação aos níveis de MMPs foi demonstrada em cartilagem humana com OA. Considera-se que o balanço entre MMPs, e TIMP seja importante para a progressão da degradação da cartilagem articular (MCILWRAITH, 1996; CLEGG et al., 1998).

3.2. Cartilagem hialina

Nas articulações sinoviais, as extremidades ósseas são recobertas por cartilagem hialina que está presente nas placas de crescimento epifisário (MOREIRA-TEIXEIRA et al., 2011). Possui a função principal de promover uma superfície lisa e lubrificada para a articulação facilitando a transmissão de cargas de baixo coeficiente de fricção, entre as superfícies ósseas (BUCKWALTER, 1998; FOX et al., 2009). A matriz cartilaginosa é constituída por colágeno e macromoléculas de proteoglicanos, glicosaminoglicanos, ácido hialurônico e sulfatos de condroitina (ROSS & PAWLINA,

2012). A cartilagem articular é composta por matriz extracelular e tipos celulares altamente especializados como os condrócitos que representam 10% do tecido, a matriz extracelular é composta por água (60-80%), fibras colágenas do tipo II (10-20%), proteoglicanos (10-15%) e de outras proteínas, glicoproteínas não colágenas em quantidades menores (BUCKWALTER et al., 2005; FOX et al., 2009).

Os condrócitos, células mesenquimais, têm grande importância no metabolismo da cartilagem, pois, sintetizam os principais elementos da matriz, as substâncias anabólicas, necessárias para a síntese, chegam através do fluxo trans sinovial, participam desse fluxo os capilares e vasos linfáticos da sinóvia, entre esta e os condrócitos há uma verdadeira troca de nutrientes e catabólitos (FELICE et al., 2002).

Os GAG/s sulfatados vão, por ligação covalente, unir-se a uma cadeia proteica (*core-protein*), e formar uma das mais complexas macromoléculas biológicas, o proteoglicano (PTG) ou agrecan. A “core-proteína” dos agrecanos é formada de três domínios globulares (G1, G2 e G3) e dois domínios lineares (E1 e E2). Os domínios globulares G1 e G2, separados pelo pequeno domínio linear E1, formam a extremidade amino terminal. Segue-se o longo domínio linear E2 que termina no domínio globular G3 (carboxiterminal). O local preferencial da “core-proteína”, aonde vão se fixar as Glicosaminoglicanas (GAGs), através de uma ligação xilose-O-serina, é a cadeia linear E2. (CAMPION & HARDINGHAM. 1993). Os agrecanos logo que são secretados pelos condrócitos vão se fixar nas moléculas de ácido hialurônico, formando o “complexo agregado da PTG/s”, a região de ligação está formada pelo ácido hialurônico (AH), pelo domínio G1 do proteoglicano (PTG) e pela *link protein* (LP), a tríplice junção (AH-G1-LP) forma uma estrutura fortemente estável, muito resistente à digestão proteolítica (KUETTNER & THONAR. 1998).

Os Glicosaminoglicanos têm grande capacidade de reter água, fato importante para manter a turgescência e elasticidade da cartilagem, somente a porção líquida da matriz se constitui em 85% de seu peso total (EGGER et al., 1995).

3.3. Diagnóstico

No caso da articulação metacarpofalangeana, a anestesia diagnóstica intra-articular, o exame físico e a termografia relacionam a claudicação, a essa articulação,

porém, fornecem poucas informações quanto à progressão da doença (SAGE & TURNER, 2002; RASEIRA et al., 2007).

As manifestações radiográficas das doenças articulares, em geral, refletem as alterações ósseas patológicas dessas condições. Muitos casos, porém, como nos casos de OA e artrite infecciosa as alterações radiográficas serão típicas de uma determinada fase do processo. Essas alterações ósseas, porém estão com frequência ausentes no curso inicial da doença, sendo observadas normalmente na fase mais tardia do curso da doença (STASHAK, 2002).

O exame ultrassonográfico articular é utilizado na rotina, em duas situações, quando o exame clínico indicou que o foco de dor é articular, porém, o exame radiográfico não demonstrou alterações e quando o exame radiográfico revela irregularidades, porém, a avaliação de tecidos moles locais necessita ser realizada para complementação diagnóstica (ALVES, 1998). Estudos conduzidos por Denoix (1996) e Denoix e Busoni (1998) demonstraram que a ultrassonografia pode ser mais sensível que a radiografia para identificação de osteófitos e análise do remodelamento periaricular nas fases iniciais da doença, podendo levar a uma avaliação em tempo real.

A análise do fluido sinovial deve ser um procedimento de rotina na avaliação da articulação, essa avaliação consegue prover informações viáveis em adição ao obtido através do exame clínico e radiográfico (MCILWRAITH, 1980; FRISBIE, et al., 1996). Convencionalmente a análise não irá fornecer um diagnóstico específico, porém permitirá que o clínico obtenha uma indicação do grau de sinovite e do desarranjo metabólico no ambiente articular (MCILWRAITH et al., 2001).

Em um estudo conduzido por Bertone e colaboradores (2001) avaliando a utilidade de várias citocinas do líquido sinovial para detectar, diagnosticar e caracterizar doença articular, verificou-se que a IL-6 era um excelente marcador, sendo sensível e específica. A presença de IL-6 no líquido sinovial indicava doença articular e estava altamente correlacionada com a contagem de leucócitos no líquido sinovial.

4. LÍQUIDO SINOVIAL

4.1. Análise do líquido sinovial

O líquido sinovial normal deve ser transparente, limpo, de coloração amarelo palha e com muita viscosidade, sem formação de coágulos, uma vez que no LS saudável, não há fatores de coagulação e fibrina (STEEL, 2008). O aumento na turbidez está relacionado ao aumento de celularidade que é atribuída a processos inflamatórios (STEEL, 2008). Segundo McIlwraith et al. (2001), a alteração no aspecto, é um sinal de sinovite, assim como a formação de coágulos. O líquido sinovial patológico coagula, e o tamanho deste coágulo está diretamente relacionado ao grau de sinovite (MCILWRAITH et al., 2001).

A viscosidade do LS está diretamente relacionada com a quantidade e grau de polimerização do ácido hialurônico (AH) (PERSSON, 1971), na presença de sinovite, a redução na viscosidade pode ocorrer com a diluição do LS e a quebra enzimática do ácido hialurônico (STEEL, 2008). Barnabé et al. (2005) em análise do LS obtido da bainha flexora digital de equinos, observou essa correlação positiva, que é atribuída à quantidade e qualidade de AH presente na amostra (VAN PELT, 1962; 1967; BARNABÉ et al., 2005). A formação do precipitado de coágulo de mucina pode ser avaliada em bom coágulo (normal) e totalmente deficiente (ruim). Em articulações com artrite a qualidade do precipitado diminui (STEEL, 2008). A degradação do AH no LS resulta da quimiotaxia de enzimas lisossomais e não lisossomais elaboradas pelos sinoviócitos agredidos e radicais livres derivados do oxigênio dos neutrófilos e macrófagos, durante processos inflamatórios (GOODRICH et al., 2006).

5. PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS DE FASE AGUDA

A resposta de fase aguda consiste em um conjunto complexo de reações inflamatórias, diante infecções ou lesão tecidual, deflagrada pela produção de mediadores inflamatórios pelas células ou tecidos lesados (JACOBSEN, 2007). Durante o processo inflamatório e injúria tecidual o organismo procura restabelecer a homeostase, durante esse esforço do organismo, efeitos locais caracterizados pelos sinais cardi-

nais da inflamação tumor, calor, rubor, dor e perda de função e sistêmicos como hipertermia, elevadas concentrações de cortisol, leucocitose, leucopenia, alteração metabólica e alteração nas concentrações de cortisol, leucocitose, leucopenia, alteração metabólica e nas concentrações de proteínas plasmáticas denominadas de proteínas de fase aguda (PFA) (ECKERSALL, 2000).

Essas são consideradas componentes da resposta imune inata de caráter inespecífico. Suas concentrações estão diretamente relacionadas a gravidade do dano tecidual, sendo assim a quantificação dessas proteínas pode fornecer informações diagnósticas e prognósticas (MURATA et al., 2004). Essas proteínas são sintetizadas pelos hepatócitos através da sinalização por mediadores inflamatórios como o TNF- α , a IL-1 e IL-6 (MEDZHITOV, 2010).

5.1. Desencadeamento da resposta de fase aguda

As citocinas agem em resposta a estímulos químicos conhecidos como mediadores, os principais mediadores considerados importantes na doença articular incluem metaloproteinases, agrecanases, prostaglandinas, radicais livres, citocinas (McILWRAITH, 2016). O aumento das citocinas circulantes provoca a estimulação da resposta de fase aguda no fígado. Segundo Jensen e colaboradores (1998) no mecanismo de estimulação hepática para a produção de proteínas de fase aguda podemos expor três variantes fundamentais segundo as citocinas implicadas:

A IL-6 se une ao seu receptor específico provocando a fosforilação do fator de transcrição, que se transloca em direção ao núcleo onde media a transcrição dos genes que codificam a produção de proteínas de fase aguda. A IL-1 e TNF- α ligam-se a seus respectivos receptores e provocam a degradação do inibidor do fator de transcrição permitindo assim a produção deste fator e a ativação subsequente dos genes de fase aguda no núcleo da célula. Por sua vez a IL-6 e o TNF- α estimulam a liberação de hormônio adrenocorticotrófico, incrementando deste modo a liberação de glicocorticóides por parte das glândulas adrenais. Os glicocorticóides exercem uma dupla função contraditória e todavia não conhecida com exatidão já que por uma parte, incrementam o efeito estimulante das citocinas sobre o fígado, entretanto por sua vez estabilizam os monócitos inibindo assim a liberação de citocinas pró inflamatórias (HEINRICH et al., 1990).

No tecido sinovial as células mononucleares, os fibroblastos e sinoviócitos, contribuem com a síntese excessiva da IL-6 (FIRESTEIN et al., 1990), principalmente produzida em resposta a estímulos específicos como a liberação de lipopolissacarídeos da membrana celular de bactérias e estímulos de outras citocinas como IL-1, TNF, fator de crescimento derivado de plaquetas ou a própria IL-6 (PABLOS ALVAREZ, 2009).

5.2. Classificação das proteínas de fase aguda

As proteínas de fase aguda podem ser classificadas seguindo alguns critérios, como, a resposta quantitativa ante um estímulo e a função biológica que desempenham (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001).

Proteínas de fase aguda negativas. Aquelas em que os níveis diminuem enquanto produzem a resposta de fase aguda (HEINRICH et al., 1990). Dentro deste grupo encontram-se proteínas como a albumina, pré-albumina e a transferrina.

Proteínas de fase aguda positivas. Aquelas cujos níveis aumentam quando produzem a resposta de fase aguda. Embora existam diferenças entre espécies, as proteínas de fase aguda positiva geralmente dividem-se em três grupos (KUSHNER et al., 1981), aqueles cujos níveis vem aumentando em 50%, aqueles que apresentam de 2 a 3 vezes sua concentração normal e aquelas que apresentam aumentos rápidos de até 1000 vezes a sua concentração normal.

Proteínas de fase aguda que intervêm na defesa do hospedeiro. Definidas como aquelas que intervêm na adaptação ou defesa do organismo hospedeiro frente ao patógeno, como: Proteína C reativa, amilóide sérico A, componentes do sistema complemento e o fibrinogênio.

Proteínas inibidoras das serino proteases. Essas proteínas desempenham um papel muito importante, ao limitar a atividade das enzimas liberadas pelas células fagocitárias, protegendo assim a integridade tecidual do hospedeiro, neste grupo encontram-se: α -antitripsina e α 1-antiquimotripsina.

Proteínas transportadoras com atividade antioxidante. Este grupo de proteínas possui uma importante função, protegendo os tecidos hígidos do hospedeiro dos

radicais livres que são liberados por parte das células fagocitárias durante a inflamação, neste grupo encaixam-se: ceruloplasmina, haptoglobina e hemopexina.

6. INTERLEUCINA 6 (IL-6) E DEGRADAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR

A IL-6 é uma glicoproteína de 22 a 27 kDa, secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e células da glia, sendo TNF- α e IL-1 potentes indutores (OLIVEIRA et al., 2011). Essa interleucina é um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infecção, cirurgias e queimaduras (OLIVEIRA et al., 2011). Mediadora central da resposta de fase aguda e principal citocina pró-coagulante, que estimula o fígado, determinando a produção e a elevação das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, amiloide sérico A (ASA) dentre outras proteínas (VOLP et al., 2008).

Iniciada a degradação da cartilagem, as células sinoviais e inflamatórias fagocitam os produtos da quebra do tecido liberados no líquido sinovial e secretam citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL-1 a IL-6) e o TNF- α envolvidos no desenvolvimento da OA (AMIN & ABRAMSON, 1998; ADAMAPOULOS et al., 2006; STANNUS et al., 2010; VALDES et al., 2010; GOEKOOP et al., 2010). Estas citocinas são responsáveis pelo aumento nos níveis de prostaglandinas e de óxido nítrico (NO), descritos como mediadores da inflamação e destruição da cartilagem (BENTO et al., 2005; FIORITO et al., 2005; BRENNER et al., 2003). A presença desses componentes no líquido articular estimula as atividades proteolíticas das células inflamatórias, o que resulta em maior liberação de fragmentos da cartilagem (proteoglicanos e glicosaminoglicanos) no líquido sinovial, estes fragmentos da cartilagem no LS podem ser potencialmente agravantes para o quadro de OA, devido a relação quimiotática entre os glicosaminoglicanos e as células polimorfonucleares (MOORE et al., 1989,1993), esse processo todo contribui para a formação de um ciclo que pode perpetuar o processo osteoartrítico e ser importante na progressão da doença (FRANCO et al., 2008).

7. AMILÓIDE SÉRICO A

Segundo Cooper (1990), Pannen e Robothan (1995) o amilóide sérico A (ASA) é uma apolipoproteína que se associa com as lipoproteínas de alta densidade durante a resposta de fase aguda. Nos equinos é considerada a proteína de fase aguda de eleição, observando-se elevada em casos de infecções bacterianas, virais experimentais ou naturais, tanto em adultos quanto em neonatos (PEPYS et al., 1989; KENT & WHITWELL, 1991).

A família da ASA originalmente considerou incluir apenas um único precursor circulante da proteína amiloide A do qual se deriva o nome. A proteína amiloide A é o principal componente das placas amiloides secundárias, que podem ser depositadas em muitos órgãos como uma consequência ocasional de doença inflamatória crônica (HUSBY et al., 1994). A família do amilóide sérico A é agora conhecida por conter um número de apolipoproteínas diferencialmente expressas, que são sintetizadas primeiramente pelo fígado e que podem ser divididas em duas classes principais baseados na capacidade de resposta ao estímulo inflamatório. O amilóide sérico A de fase aguda (A-ASA) é o principal arquétipo das proteínas de fase aguda dos vertebrados, e ao ser induzido durante a inflamação, pode atingir concentrações no plasma maior que 1000 vezes os valores encontrados em repouso, podendo exceder 1mg/ml^{-1} (KUSHNER, 1982; HOFFMAN & BENDITT, 1982; MARHAUG, 1983), implicando em um importante papel benéfico no sistema de defesa do hospedeiro. Durante a inflamação o, A-ASA está associado predominantemente com a terceira fração das lipoproteínas (High Density Lipoprotein HDL3) (ERIKSEN & BENDITT, 1980) reposicionando a apolipoproteína A-1 (ApoA-1) como a apolipoproteína predominante nesta partícula (COETZEE et al., 1986).

O amiloide sérico A constitutivo (C-ASA) foi relatado em duas espécies, a humana (WHITEHEAD et al., 1992) e no camundongo (de BEER et al., 1994). Diferentemente do, A-ASA, o C-ASA, é minimamente induzido durante a resposta de fase aguda, estão associados tanto ao HDL normal como ao de fase aguda (WHITEHEAD et al., 1992; de BEER et al., 1995).

8. PENTOSAN POLISULFATADO SÓDICO

8.1. Pentosan polisulfatado sódico

O pentosan polisulfatado (PPS) é um polímero modificado semissintético com massa molecular de 4000 – 6000 daltons, derivado da hemicelulose da árvore de faia (*“beech wood”*). A sua molécula é de um derivado de mucopolissacarídeo que quimicamente e estruturalmente se assemelha a outros glicosaminoglicanos (GAGs), incluindo o anticoagulante heparina. Em contraste à heparina e outros GAGs, o PPS apresenta grande biodisponibilidade por via oral e com poucos efeitos tóxicos, até mesmo quando administrado em altas doses (ODLIND et al., 1987; MARSHALL et al., 1997).

Em modelos animais o PPS apresentou um efeito inibitório sobre as metaloproteínases (MMPs), interleucina-1 e outros mediadores inflamatórios. Apresentou capacidade de aumentar tanto a síntese quanto o massa molecular do hialuronato (HA); capaz de promover aumento na captação de Proteoglicanos na matriz extracelular; e por possuir efeitos anti-inflamatórios e capacidade fibrinolítica (FRANCIS, et al., 1989; NETHERG, et al., 1992; LITTLE, et al., 1993; ROGACHEFSKY, et al., 1993; GHOSH, et al., 1993; SMITH, et al., 1994; CLEGG, et al., 1998; FREAN, et al., 2002). Possui maior grau de sulfatação, quando comparado à heparina, e, portanto, uma maior densidade de carga negativa. Assim como outros GAGs, sua estrutura e propriedades químicas permitem que o PPS ligue se preferencialmente ao glicocálice de células sanguíneas circulantes e também de células endoteliais (MAFFRAND et al., 1991; GHOSH & HUTADILOK, 1995). O pentosan polissulfatado sódico é 1/15 tão eficaz quanto a heparina no que se refere a atividade anticoagulante. Seus múltiplos efeitos na coagulação, fibrinólise, nas funções plaquetárias e nas células vasculares levaram ao estudo do PPS em uma ampla gama de distúrbios clínicos, como antagonismo de atividades enzimáticas (elastase de leucócitos, heparinase, proteínas quinases e transcriptase reversa) e inibição da infectividade do HIV (MAFFRAND et al., 1991). O PPS inibe as células cancerígenas com potencial metastizante, promove aumento da lipoproteína lipase e a atividade da lipase triglicerídeos hepáticos (BARROWCLIFFE et al., 1986; MCLESKEY et al., 1996).

Também serve como agente anti-inflamatório e tem sido benéfico em modelos experimentais de artrite, principalmente por inibir a produção da interleucina-6 (SMITH et al., 1994). Clinicamente, tem sido utilizado como um agente antitrombótico e é aprovado nos Estados Unidos da América a sua utilização nos cuidados de pacientes com cistos intersticiais (PARSONS & MULHOLLAND, 1987; PARSONS et al., 1994). Em um trabalho, conduzido por Herrero et al (2015) utilizando o PPS, no tratamento de artrite induzida por alfa vírus, demonstrou que o fármaco possui capacidade de reduzir tanto a fase aguda inflamatória na musculatura (o vírus provoca mio-sítes, assim como a febre chikungunya), quanto na articulação, além de ser um fármaco extremamente segura, com poucos efeitos colaterais e aprovada por uma série de agências de saúde ao redor do globo.

Entretanto, existem poucas evidências experimentais sobre a eficácia do PPS para a prevenção e tratamento da OA em cavalos (LITTLE, 1996; GHOSH, 1999; MCILWRAITH, et al., 2012). Recentemente, em um modelo de fragmento osteocondral, demonstrou melhorar o escore de fibrilação da cartilagem e aumentou as concentrações do epítipo de sulfato de condroitina (CS 846) no líquido sinovial de cavalos tratados, comparados aos controles que receberam a injeção de solução salina (MCILWRAITH et al., 2012).

Os GAGs possuem propriedades anti-inflamatórias (ENGELBERG, 1996). Sabe-se a muito tempo que a heparina e outros GAGs inibem tanto a via clássica quanto a via alternativa de ativação do complemento (ECKER & GROSS, 1929). GAGs com domínios estruturais sulfatados, são capazes de regular uma ou mais proteases de serina na cascata do complemento (RAEPPLÉ et al., 1976; SHARATH et al., 1985; MERI & PANGBURN, 1990; WEILER et al., 1992). Estudos demonstraram que os GAGs inibem a ativação do complemento *in vivo*, independentemente da ação no sistema de coagulação (WEILER et al., 1992; BLACK et al., 1995; GRALINSKI et al., 1996). Embora o pentosano possua inúmeras ações farmacológicas, que incluem efeitos antitrombóticos e a capacidade de inibir muitas enzimas, como elastase, heparinase e as quinases, seus efeitos sobre a ativação do sistema complemento no miocárdio ainda não foi apurado. A ativação do sistema complemento foi demonstrada ocorrer, durante a isquemia miocárdica, a lesão por reperfusão, por exemplo,

durante a trombólise e procedimentos que incluem o transplante cardíaco e o balão para angioplastia (FOX, 1990; KILGORE et al., 1994).

O PPS tem sido utilizado amplamente na prática clínica na Austrália por mais de 20 anos (LITTLE et al., 1996; GHOSH, 1999; FULLER et al., 2002). Os médicos veterinários tiveram de confiar nos resultados de pesquisas realizadas com outras espécies, aceitar recomendações de fabricantes ou, mais comumente, utilizar suas próprias experiências quando optaram por qual o intervalo de aplicações do PPS (KRAMER et al., 2014). Com base no uso generalizado, seria razoável supor que a experiência clínica sugere que o PPS possui efeitos benéficos no tratamento; no entanto, não há evidências documentadas sobre como ele está sendo utilizado ou sobre sua eficácia na prevenção ou tratamento da OA (KWAN et al., 2012).

8.2. Doses e vias de administração do PPS

Em um trabalho realizado em parceria com 220 veterinários australianos, verificou-se que a dose utilizada era de 3 mg/kg por via intramuscular (IM) por 4 semanas (KWAN et al., 2012). A recomendação do fabricante para a administração IM nos cavalos variam de 2 a 2.5 mg/kg, IM, a cada 5 ou 7 dias num total de 4 injeções (Cartrophen Vet® 10mL x 100 mg/mL ou Cartrophen Equine Forte® 4 mL x 250 mg/mL; Biopharm Austrália Pty Ltd. NSW, Aust) ou 3 mg/Kg, IM uma vez por semana por quatro semanas (Pentosan Equine® 6 mL x 250 mg/mL; CEVA Animal Health, NSW, Aust) (KWAN, et al., 2012).

Em um estudo conduzido por Pearce, Chen e Jain (2018) com pacientes humanos, que possuíam histórico de lesão oftálmica e que utilizaram o PPS por um período médio de 186 meses (faixa de 144 - 240 meses). Cinco pacientes foram tratados com doses de 400mg e 300mg diárias. Simonaro et al (2016) em um estudo conduzido com cães, utilizou a dose de 1.6 mg/kg, essa dose foi baseada após a publicação de um estudo sobre a mucopolissacaridose em ratos, e que utilizou a dose segura de 2 mg/kg.

Kwan e colaboradores (2012) avaliaram a eficácia do PPS administrado por via intra-articular (articulação cárpica), obedecendo a concentração de 625 mg (5 ml - 125 mg/ml) associado a glucosamina 1 g (5 ml - 200 mg/ml) para o grupo tratamento e 5 ml de solução salina estéril para o grupo controle. Após o período experimental,

os dados revelaram que os animais que receberam o PPS, apresentaram um aumento na viscosidade do líquido sinovial, nos três primeiros dias, entretanto o autor revela não poder revelar efeitos consistentes quanto à viscosidade do líquido sinovial do grupo controle frente aos dados obtidos na avaliação do grupo tratamento (PPS + glucosamina), e cita ainda a necessidade de um estudo, que utilize a administração intra-articular de PPS, em articulações com osteoartrite (de ocorrência natural ou induzida) para então obter respostas quanto ao uso terapêutico do PPS por outras vias de administração.

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1. Animais experimentais

Este projeto de pesquisa foi desenvolvido na Unidade Didático Clínico Hospitalar, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (UDCH/FZEA), Campus de Pirassununga, São Paulo e no Hospital Veterinário Vicente Borelli, do Centro Universitário Octávio Bastos (HOVET/UNIFEOB), localizado na cidade de São João da Boa Vista, São Paulo. Protocolo CEUA aprovado pela comissão CEUA do Centro Universitário Octávio Bastos — Unifeob, número 2018.1 recebido em 07/02/2018, aprovado em 19/02/2018.

Foram utilizados 10 cavalos (*Equus caballus*) sendo 5 machos e 5 fêmeas, com idade variando entre 5 e 23 anos ($13,4 \pm 5,37$ anos), sem raça definida, com peso corpóreo entre 400 e 650 kg. ($395,5 \pm 63,87$ kg.) Dentre estes 10 animais, cinco foram provenientes do biotério de equinos da UDCH/FZEA e cinco da fazenda escola do Centro Universitário Octávio Bastos - UNIFEOB.

Figura 1. Imagens das instalações utilizadas para o desenvolvimento do presente estudo. A. pavilhão 1 das cocheiras; B. cocheiras de alojamento; C. tronco de contenção; D. pavilhão 2 das cocheiras.

Todos os animais foram mantidos em regime semi-extensivo de criação, antes do período experimental, alocados em cocheiras e piquetes individuais, recebendo água de boa qualidade *ad libidum*, feno de Tifton do tipo A (1% do peso vivo) e ração comercial para equinos (1% do peso vivo). Antes do início do período experimental, foram vacinados e vermifugados, conforme orientação dos responsáveis pelos biotérios e não apresentavam sinais de doenças infectocontagiosas. Não possuíamos informações referentes a atividades esportivas equestres (e.g. Três tambores, Salto) e/ou atividades de lazer (e.g. Cavalgadas) pregressas.

9.2. Delineamento experimental

O início do experimento foi denominado como D0, momento em que ocorreu a seleção dos animais e avaliação clínica para diagnóstico a fim de verificar a presença ou ausência de doença sistêmica (e.g. pneumonia, babesiose, entre outras) e presença de lesões radiográficas condizentes com osteoartrite. Para tanto foi realizada a coleta de sangue, proveniente da jugular externa, após antissepsia com iodopovidona degermante 10%, gaze e álcool 70%, para realização de hemograma. Ato contínuo foi realizado exame físico (frequência cardíaca, frequência respiratória, mucosas, tempo de preenchimento capilar, temperatura retal) e inspeção minuciosa das articulações, em busca de pontos de perda de continuidade da pele, que pudessem abrigar infecção do tecido subcutâneo, o que comprometeria o procedimento clínico. Foi realizado um exame físico específico para o aparelho locomotor em busca de identificação positiva para doença articular degenerativa (*i.e.*, Osteoartrite), no qual os animais foram avaliados quanto aos possíveis distúrbios de marcha e, em sequências, foram realizados os testes de flexão das articulações, para identificar os focos de dor. Os animais selecionados foram submetidos a exame que compreendeu inspeção do grau de efusão sinovial e análise macroscópica, bioquímica e citológica do líquido sinovial. Também, os animais foram avaliados por meio de exames radiográficos.

Como critério de seleção, para que os animais fossem aceitos no experimento deveriam apresentar: (1) histórico de doença articular; (2) efusão sinovial excessiva; (3) sinal de dor articular e alterações de marcha; (4) aumentos de volume no boleto; (5) sem evidências de doença sistêmica; (6) aparência e volume do líquido sinovial

alterados no momento da artrocentese. A padronização dos exames foi baseada pela pesquisa de Silva e colaboradores (2014). Desta forma, os que não apresentaram resposta positiva aos critérios de análise foram excluídos do experimento.

Grupo controle: Tratamento 1. Antes da colheita do líquido sinovial em D0, os animais selecionados foram submetidos a análise dinâmica da marcha através de registro por vídeo, a fim de estabelecer um parâmetro inicial do grau de claudicação. Após rigorosa antisepsia, com iodopovidona degermante 10%, álcool 70% e iodopovidona tópico 10%, uma agulha estéril 30x08 foi introduzida através do recesso palmar da articulação metacarpofalangeana e 1 ml de líquido sinovial foi aspirado e analisado macroscopicamente quanto às características físicas de acordo com Barnabé e colaboradores (2005) e armazenado em tubo do tipo eppendorf e freezer - 20°C, para posterior análise laboratorial. Em seguida, foi realizada a administração de fenilbutazona (Equipalazone® 4,4mg/kg SID), por punção venosa com agulha estéril 30x08 e seringa de 10ml, por um período de 5 (cinco) dias (D0 ao D5).

O período experimental D0 - D5 foi definido como período controle e, para fins estatísticos, também foi denominado, como Tratamento 1 (D0-D5). Neste período controle, avaliou-se o resultado do tratamento da afecção articular com AINE.

Em D5 foi realizada nova avaliação, em relação ao exame de claudicação e teste de flexão, inspeção visual do grau de efusão sinovial, e uma nova amostra de líquido sinovial foi colhida por artrocentese e as amostras foram avaliadas conforme técnica descrita por Barnabé et al (2005).

Essa primeira etapa que compreendeu o período em que os animais receberam fenilbutazona por 5 dias, foi considerado o grupo controle, após o D5, um intervalo de 7 (sete) dias foi realizado, período de “wash out”, a fim de evitar interferência nos resultados da próxima etapa experimental que compreende a fase de administração do pentosan polissulfatado sódico.

Grupo Tratamento 2. Corresponde ao tratamento com administração do fármaco PPS por via intra-articular. No início do momento experimental foi realizada nova avaliação dinâmica da marcha e registrada por vídeo em relação ao teste de flexão, grau de efusão sinovial, e colheita de líquido sinovial (T0). Na sequência 1ml de PPS foi administrado por articulação (xxxxx® 125mg/ml). Este procedimento foi

repetido a cada sete dias, realizando-se um total de quatro administrações (T0, T7, T14, T21). Nestes mesmos tempos, os animais foram avaliados em relação ao teste de flexão, grau de efusão sinovial e inspeção visual do líquido sinovial. As amostras de LS foram avaliados quanto às concentrações de Interleucina-6 (IL-6) e Amilóide Sérico A (ASA).

Figura 3. Esquema delineamento experimental

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

9.3. Avaliação da claudicação e respostas aos testes de flexão

Para avaliação da claudicação antes e após a flexão forçada, foi utilizado o método subjetivo, que consistiu em exame estático realizado pela equipe de pesquisa e dinâmico (passo, trote e trote após flexão), o qual foi registrada com câmera filmadora (Sony® Handycam Ultra HD), para posterior avaliação por quatro examinadores externos ao projeto, com experiência clínica comprovada. Todos os exames do aparelho locomotor foram realizados em busca de alterações de marcha e respostas ao teste de flexão forçada das articulações. Os testes de flexão das articulações foram realizados nos dias 0 (D0) e 5 (D5), semanalmente durante quatro semanas, ou seja, nos

tempos 0 (T0), 7 (T7), 14 (T14), 21 (T21), 28 (T28) e com 30 e 60 dias (T30 e T60) por motivo de logística, não foi possível padronizar um único local para exame, porém foi padronizado o piso duro (asfalto e concreto).

Os graus de claudicação seguiram o postulado por Stashak (2002). Para tanto, foram realizadas imagens dos animais ao passo, ao trote, e como os animais foram previamente selecionados era de conhecimento da equipe quais membros e quais articulações apresentavam dor e por este motivo foram realizadas as avaliações ao trote após flexão forçada.

Quanto ao processo de filmagem, a câmera foi posicionada sobre um tripé, e um único operador, realizou as imagens de cada cavalo, no sentido de ida e vinda do animal, tanto pela visão frontal, para avaliação do movimento de cabeça, quanto lateral para avaliarem-se as fases craniais e caudais da passada (Fig. 4). Por animal, foi gerado um total de 18 vídeos (D0, D5, T0, T7, T14, T21, T28, T30 e T60), cada vídeo foi atribuído um código, que era de conhecimento único e exclusivo da equipe de trabalho. Os vídeos foram enviados de maneira aleatória aos quatro avaliadores externos, que deveriam atribuir graus de claudicação e alterações de fases de passada, preenchendo formulário específico elaborado pela equipe de pesquisa. Ao término do preenchimento por cada avaliador, os formulários respondidos foram enviados via e-mail diretamente à equipe, que computou os dados.

Figura 4. Ilustração dos posicionamentos de filmagem.

Inicialmente um auxiliar foi orientado a conduzir o animal a passo por uma distância máxima de 20 metros. As instruções eram de que ele ficasse fora do campo de filmagem para não interferir na posterior avaliação, e deveria manter o cabo do cabresto sem tração, a fim de não bloquear ou camuflar movimento de cabeça principalmente. Inicialmente, foi filmado o animal indo e vindo para obter a visão frontal e posterior, bem como, pela incidência lateral, após o exame ao passo o auxiliar era instruído a repetir as orientações, entretanto neste momento o animal era conduzido ao trote.

O teste de flexão consistiu da flexão forçada, isolada, da articulação a ser avaliada, em busca de alterações de movimentação. A articulação que indicava sinal doloroso (*i.e.* claudicação), determinada pela avaliação da equipe, era então mantida em flexão forçada por um minuto e, novamente, era requisitado que o auxiliar trocasse o animal seguindo as mesmas orientações anteriores.

Ao teste de flexão positivo, foi observado, o aumento do arco de elevação do membro torácico testado, e encurtamento da fase cranial da passada (Stashak, 2002). A resposta ao teste de flexão da articulação, acometida pela lesão articular, foi graduada e classificada em uma escala (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição do grau de claudicação e escore de acordo com o teste de flexão.

Grau de Claudicação	Escore
Claudicação não perceptível em nenhuma circunstância.	0
Claudicação é vista quando o cavalo está ao trote, mas não quando está ao passo.	1
Claudicação é percebida ao passo, mas não há movimentação óbvia da cabeça associada a esta.	2
Claudicação é óbvia ao passo, e há movimentação característica da cabeça	3
Impotência funcional do membro.	4

Fonte: Stashak, (2002).

9.4. Avaliação da efusão sinovial

O aumento do volume articular, ou efusão articular, foi avaliado por meio da mensuração em centímetros, do diâmetro articular. Com o auxílio de fita métrica, um membro da equipe de pesquisa, posicionou a fita ao redor da articulação, e os dados obtidos foram armazenados. As avaliações da efusão sinovial das articulações foram realizada nos dias 0 (D0), 5 (D5) e semanalmente durante quatro semanas, ou seja, nos tempos 0 (T0), 7 (T7), 14 (T14), 21 (T21), 28 (T28) e com 30 e 60 dias (T30 e T60).

As articulações foram avaliadas quanto à presença de efusão articular classificada em uma escala de escores (Tabela 2) adaptada de Silva e colaboradores (2014) Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo - São Paulo-SP.

Tabela 2. Classificação de efusão articular.

Acréscimo em centímetros, da articulação acometida	Escore
Menor ou igual a 0,5 cm	0
De 0,6 a 2,0cm	1
De 2,1 a 4,0cm	2
De 4,1 a 6,0 cm	3
Maior ou igual a 6,1cm	4

Fonte: Adaptado de Silva, (2014).

9.5. Estudo radiológico

As imagens radiográficas foram realizadas para fins diagnósticos, com o auxílio de um emissor de raio x, modelo ORANGE®9020 HF- 90 kV/20 mA/30 mAs. 220v/1.35kw 80kV. As imagens obtidas foram digitalizadas por meio do aparelho CR 30 – X AGFA-Geavaert® N.V. Bélgica.

Previamente ao início do experimento (D0), com o membro corretamente posicionado, foi realizado o estudo radiológico. Para o estudo foram preconizadas, as seguintes projeções, dorsopalmar, lateromedial, dorsolateral palmaromedial 45° oblíqua, dorsomedial palmarolateral 45° oblíqua, e a projeção lateromedial flexionada.

Os exames radiográficos visavam a avaliação das estruturas ósseas, espaço articular, presença de osteófitos e fragmentos osteocondrais. As imagens radiográficas foram encaminhadas via e-mail a avaliadores externos ao projeto, os quais deveriam preencher uma tabela com achados e pontuações pré-estabelecidas, conforme Tabela 3. A fim de tornar a avaliação "cega", as imagens radiográficas foram identificadas apenas quanto à projeção executada e onde seria lateral e medial. Os animais eram identificados por códigos que iam de A1 (animal experimental 1) a A10 (animal experimental 10).

Ao final do estudo, os avaliadores retornavam o e-mail com as tabelas assinadas e a equipe responsável pelo projeto de pesquisa, convertia os assinalados em pontuações. Quanto mais alta a pontuação obtida, mais comprometida era a articulação. Cada tópico avaliado, apresentava cerca de 5 achados radiográficos, ordenados de maneira crescente à gravidade, sendo 0 de menor gravidade e 5 de maior gravidade. Os dados coletados foram avaliados tópico a tópico e apresentados na forma de porcentagem de resposta.

Tabela 3. Ficha de avaliação radiográfica

Parâmetros avaliados através do exame radiográfico	Escore
1.Aumento de volume de tecidos moles	
Nenhum	0
Pequeno abaulamento tecidual localizado	1
Pequeno abaulamento tecidual difuso	2
Moderado abaulamento tecidual	3
Acentuado abaulamento tecidual	4
Abaulamento tecidual envolvendo planos além da área articular em estudo	5
2.Presença de mineralização de tecidos moles	

Nenhum	0
Suspeito	1
Áreas de estriações difusas ou localizadas	2
Áreas densas localizadas	3
Áreas densas difusas	4
Áreas densas difusas e generalizadas além da área articular em estudo	5

3. Presença de aumento da interlinha radiográfica

Normal	0
Suspeito	1
Pequeno	2
Evidente com relação óssea mantida	3
Ampla com perda parcial da relação óssea (subluxação)	4
Ampla com perda total da relação óssea (luxação)	5

4. Presença de diminuição da interlinha radiográfica

Normal	0
Suspeito	1
Leve estreitamento com orientação simétrica ou assimétrica	2
Moderado estreitamento de forma simétrica ou assimétrica e mantendo a definição	3
Acentuado estreitamento com pouca definição	4
Indefinição da interlinha radiográfica	5

5. Evidência de osteófitos e proliferações ósseas

Nenhum	0
Discreta projeção óssea localizada em uma das faces ósseas	1
Discretas projeções ósseas entre as faces ósseas	2
Projeção óssea proeminente, organizada e localizada	3
Projeções ósseas proeminentes, organizadas observadas em mais de uma projeção	4
Extensas projeções ósseas irregulares observadas em mais de uma projeção	5

6.Evidências de enteseófitos

Nenhum	0
Leve nebulosidade em topografia de inserção de cápsula e ligamentos articulares	1
Linhas ou discreta ponte de mineralização na topografia de inserção de cápsula ou ligamentos	2
Projeção óssea organizada e facilmente reconhecida na topografia de inserção de cápsula ou ligamentos	3
Projeção óssea evidente e irregular na topografia de inserção de cápsula ou ligamentos	4
Extensa reação óssea desorganizada na topografia de inserção de cápsula e ligamentos	5

7.Presença de esclerose subcondral

Nenhum	0
Suspeita ou placa óssea subcondral discretamente mais densa	1
Área de esclerose localizada	2
Moderada esclerose subcondral difusa e de densidade radiográfica com distribuição heterogênea	3
Moderada esclerose subcondral difusa e de densidade radiográfica com distribuição homogênea	4
Evidente esclerose subcondral difusa e estendendo para a trabeculação da epífise	5

8.Presença de osteólise subcondral

Nenhum	0
Pequenas ondulações na margem subcondral, levemente irregular	1
Erosão superficial do osso subcondral localizada	2
Erosão superficial do osso subcondral generalizada	3
Erosão irregular proeminente ou lisa cística na margem subcondral ou com discreta extensão para a epífise	4
Severa erosão ou lesão cística estendendo-se pela epífise	5

9.Evidência de fragmentos osteocondrais

Nenhum	0
--------	---

Fragmento osteocondral único sutil pouco definido e não deslocado	1
Fragmento osteocondral único bem definido e não deslocado	2
Dois fragmentos bem definidos e não deslocados	3
Múltiplos fragmentos no local ou fragmento deslocado	4

Fonte: Adaptado de Silva, (2014).

9.5.1. Avaliação hematológica e bioquímica sérica

As amostras de sangue dos animais foram colhidas em T0 e T28 e foram analisadas junto ao laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário Vicente Bonelli do Centro Universitário Octávio Bastos – UNIFEOB, a fim de verificar possíveis alterações sistêmicas da administração de pentosan polissulfatado sódico por via intra-articular.

O volume de 4 mL de sangue foi coletado através da punção da veia jugular, direita ou esquerda e o anticoagulante utilizado foi o EDTA 10%. Para análise da série vermelha utilizou-se o método de diluição e contagem manual em câmara de Neubauer que foram examinadas em microscópio com aumento de 400x para contagem de hemácias e com aumento de 100x para contagem de leucócitos. Esfregaços de sangue foram preparados e corados pelo corante Wright ou por panótico rápido, para estudo dos elementos figurados do sangue. Em seguida, as preparações citoscópicas foram examinadas ao microscópio com aumento de 1000x (imersão) para diferenciação e contagem dos leucócitos. O volume globular foi avaliado pela técnica do microhematócrito.

Para o exame de bioquímica sérica perfil hepático (AST, GGT e FA) e renal (uréia e creatinina) foram utilizadas as amostras do soro obtidas após sinérese de sangue coletado por punção das veias jugular direita ou esquerda as quais foram avaliadas em analisador bioquímico automático.

9.6. Colheita do líquido sinovial

Com o animal em posição quadrupedal, contido em tronco metálico e pelo uso do “cachimbo”, foi realizada a tricotomia da articulação. Na sequência, o membro todo

foi lavado com água corrente e povidona iodo degermante a 10%. Em seguida, utilizando uma escova de paramentação, o local da punção foi escovado por 3 minutos e a espuma formada, foi retirada com álcool 70% e gaze; este procedimento foi repetido mais duas vezes e por fim foi aplicado povidona iodo tópica.

A colheita foi realizada em procedimento cirúrgico estéril, com agulha 30x08, introduzida através da cápsula articular (STASHAK, 2002). Foram colhidos, no máximo, 2 ml de líquido sinovial, e esses, acondicionados em tubos estéreis.

Em T0 e T28, foram colhidas amostras de líquido sinovial, as quais foram divididas em 2 alíquotas, sendo uma alíquota encaminhada para o laboratório de análises clínicas do Hospital Veterinário Vicente Bonelli do Centro Universitário Octávio Bastos – UNIFEOB, para avaliação visual, bioquímica e citológica e a alíquota restante, armazenada em frasco tipo “eppendorf” a - 20° C até o término do experimento. Essas amostras, em conjunto com amostras de líquido sinovial colhidas nos tempos D0, D5, T7, T14, T21, T30 e T60, foram enviadas exclusivamente para o Laboratório Especializado em Análises Clínicas — LEAC, para avaliação de Interleucina-6 e Amilóide Sérico A.

9.6.1. Avaliação laboratorial do líquido sinovial

As amostras de líquido sinovial dos animais colhidas em T0 e T28 foram analisadas junto ao laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário Vicente Bonelli do Centro Universitário Octávio Bastos – UNIFEOB, a fim de verificar possíveis alterações locais que a administração de PPS IA poderia causar.

O líquido sinovial foi avaliado pelos métodos visual, bioquímico e citológico. O método visual consiste na avaliação de coloração, presença de fibrina, coágulo de mucina, sangue, entre outros. Para realização da avaliação citológica, as amostras foram processadas e analisadas segundo técnica descrita por MAHAFFEY (1992), nas quais as proteínas são determinadas por refratometria e a contagem celular realizada em hemacitômetro. A citologia do líquido sinovial foi analisada em esfregaço do líquido sinovial, obtido do sedimento após centrifugação e corada pelo método panótico de rotina.

Nas amostras de líquido sinovial foram observadas as seguintes características, aspecto, cor e volume, seguindo um roteiro experimental, essas características foram registradas para análises posteriores. As amostras foram transferidas da seringa estéril para 2 tubos de coleta, um tubo sem anticoagulante para a determinação da proteína total pelo método de biureto, e outro com EDTA para as demais determinações, para as características citológicas do líquido sinovial. As contagens globais de hemácias e células nucleadas foram realizadas com o auxílio do hemacitômetro de Neubauer, as contagens diferenciais de células nucleadas foram realizadas nos esfregaços corados com mistura de metanol, May-Grüwald e Giemsa. A proteína plasmática total sérica foi analisada em um analisador bioquímico automático.

A determinação da viscosidade relativa foi realizada no momento da transferência do líquido sinovial da seringa para os tubos, estimando-se o comprimento, em centímetros, do filamento formado pela gota antes de se desprender do bico da seringa. A viscosidade foi classificada como: (1) Bom, (2) Discretamente Diminuído e (3) Diminuído (adaptado de Barnabé et al., 2005), sendo que foi determinado como viscosidade diminuída quando o comprimento do filamento fosse inferior a 5 cm. Os mesmos graus utilizados para avaliar a viscosidade, também foi avaliado a coloração (amarelo-palha [1], avermelhado [2], vermelho [3]), aspecto (límpido [1], discretamente-turvo [2], turvo [3]) e para a formação de coágulo e/ou presença de fibrina (sem coágulo [1], estrias de sangue [2], coágulo [3]) adaptador de Pozzobon et al (2009). Para determinação do coágulo de mucina, a formação de coágulo foi avaliada visualmente na alíquota de líquido sinovial, acondicionada em tubo seco, a qual foi acrescida de ácido acético. A qualidade da formação do coágulo foi classificada como bom a ruim e atribuído o escore de 1 a 4 segundo Van Pelt (1967): (4) bom; (3) discretamente diminuído; (2) diminuído; (1) ruim. As características citológicas como as contagens diferenciais de Células Nucleadas (CN), foram realizadas em lâminas coradas com mistura de metanol, May-Grünwald e Giemsa. Foram contadas 100 células nucleadas de cada lâmina, sendo classificadas como linfócitos, grandes células mononucleares, neutrófilos segmentados e eosinófilos. As grandes células mononucleares foram constituídas pelos monócitos, macrófagos e eventuais células da membrana sinovial (Mahaffey, 1992).

9.6.2. Determinação da concentração sinovial de Interleucina 6 (IL-6) e Amiloide Sérico A (ASA)

Para a análise da IL-6e ASA, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Científicas – LEAC, onde foram analisadas através do método de imunoensaio Turbidimétrico, como descrito por JACOBSEN (2002). As alíquotas de líquido sinovial foram acondicionadas em tubo estéril sem anticoagulante, do tipo ependorf, armazenados a -20 °C até o momento da avaliação. O exame realizado seguiu as etapas descritas por Robinson e colaboradores (2017), utilizando um analisador químico automático e o kit para método de imunoensaio Turbidimétrico humano (Eiken LZ SAA test, Eiken Chemical, Mast Group, Bootle, Mersey, UK).

9.6.3. Interleucina - 6

O exame realizado seguiu as etapas descritas por Robinson e colaboradores (2017), utilizando um analisador químico automático e o kit para método de imunoensaio Turbidimétrico (cat#SEA079Eq. lot.190702240 Jul.2020 - CloudClone - Texas/USA).

A placa de microtitulação fornecida neste kit foi pré-revestida com um anticorpo específico para IL-6. Padrões ou amostras foram então adicionados aos poços apropriados da placa de microtitulação com um anticorpo conjugado à biotina específico para IL-6. Em seguida, Avidin conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) foi adicionado a cada poço da microplaca e incubado. Após a adição da solução de substrato TMB, apenas os poços que contêm, anticorpo para IL-6, conjugado com biotina e Avidin conjugado com enzima exibem uma alteração na cor. A reação enzima-substrato será finalizada após a adição de solução de ácido sulfúrico e a mudança de cor foi medida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 450 nm $\pm$ 10nm. A concentração de IL-6 nas amostras foi então determinada comparando com amostras recombinantes já conhecidas, estabelecendo uma curva padrão.

9.6.4. Amilóide sérico A

Foi adicionado aos poços de ligação inespecíficos 100µL do líquido sinovial e, aos poços de máxima ligação, 50µL. A curva padrão foi realizada em duplicata, adicionando 50µL em cada poço. Em seguida, 50µL das amostras de líquido sinovial foram adicionadas em duplicata. Com exceção dos poços de atividade total e branco, os demais receberam 50µL de *AChE Tracer*. O anticorpo monoclonal foi adicionado na quantidade de 50µL, com exceção dos poços de atividade total, ligação inespecífica e branco. A placa foi incubada por 18 horas, a 4°C e, em seguida, lavada cinco vezes com *wash buffer*. Foram adicionados 200µL de *ellman's Reagent*, preparado imediatamente antes de sua utilização, em todos os poços, e apenas o poço de atividade total recebeu 5µL do *Tracer*. A placa foi protegida da luz e mantida no agitador por 60 a 90 minutos. A absorbância da amostra foi lida a 405 nm em leitor de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão.

9.7. Análise Estatística

Os dados foram avaliados pelos testes de Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias, respectivamente. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para a avaliação do efeito do tempo e dos tratamentos entre os 10 animais utilizados no presente estudo. A avaliação entre os tratamentos e cada tempo, foi realizada por meio da *one-way* ANOVA. As comparações múltiplas resultantes da ANOVA foram realizadas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team, 2019) através de pacotes estatísticos específicos para análise estatística considerando $p < 0,05$.

10. RESULTADOS

10.1. Exame Físico

Foram analisadas as articulações: articulações metacarpofalangeana (70%), articulação tibiotársica (20%) e articulação carpiana (10%), totalizando 10 articulações. Quanto ao grau de claudicação, o grau mais avaliado foi a claudicação de grau 1 (56,6%) quando sem flexão, seguido pelo grau 0 (24,4%), grau 2 e grau 3 com 6,6% e grau 4 com 5,5%.

A avaliação subjetiva da claudicação revelou diferença significativa entre os tratamentos, sendo que no tratamento 2 (*i.e.* grupo que recebeu administração intra-articular de PPS) foi observado que os avaliadores atribuíram menor escore para o grau de claudicação tanto sem quanto com flexão, quando comparados ao grupo controle (tratamento 1), que recebeu doses de AINE, foram observados graus mais elevados em D0 e T0 (Figura 5).

Figura 5. Gráfico das avaliações do exame locomotor.

Correlação positiva foi obtida na comparação entre os valores de escore atribuídos entre os avaliadores e o valor considerado controle que foi obtido por meio da avaliação do autor. Não foi observada diferença significativa considerando $p > 0.05$.

Referente aos escores dados através de análise das filmagens, correlação de magnitude alta e positiva foi encontrada, variando de 0.91 a 1. Da mesma forma, foi observado para os escores relacionados apenas ao membro afetado.

Tabela 4. Correlação entre os escores atribuídos pelos avaliadores

Tempo	ESCORES		MEMBROS	
	Sem flexão	Com flexão	Sem flexão	Com flexão
D0	1.0	0.95	1.0	0.92
D5	1.0	0.81	0.98	0.70
T0	1.0	0.57	1.0	0.92
T7	1.0	1.0	1.0	0.98
T14	1.0	0.96	1.0	0.90
T21	1.0	1.0	0.97	0.97
T28	1.0	0.96	0.98	0.96
T30	1.0	1.0	1.0	1.0
T60	1.0	1.0	1.0	1.0

10.2. Exame Radiográfico

Após retorno e análise das fichas de avaliação, a pontuação média foi de 10 pontos referentes à soma das notas de todos os tópicos (Tabela 3). A pontuação máxima foi de 23 pontos de um total possível de 45 pontos e a menor pontuação foi um (1) ponto considerando todas as imagens realizadas em D0.

Os achados mais frequentes foram presença de mineralização de tecidos moles, aumento de volume de tecidos moles, diminuição da interlinha radiográfica e evidência de osteófitos. Referente à mineralização dos tecidos moles, a pontuação mais atribuída às imagens radiográficas dos animais experimentais foi 1 (60%), que corresponde à suspeita de mineralização; porém algumas imagens apresentaram áreas densas difusas 10% (4) e 20% foram indicados como normais (0).

Quanto ao aumento de volume de tecidos moles, os pontos mais atribuídos correspondem a achados compatíveis com pequeno abaulamento tecidual difuso (50%), porém também foi anotado pequeno abaulamento tecidual localizado (10%) e abaulamento tecidual envolvendo planos além da área articular em estudo (20%).

A diminuição da interlinha radiográfica foi avaliada em 30% dos animais com a pontuação 3, definido por moderado estreitamento de forma simétrica ou assimétrica e mantendo definição, também foram avaliadas como suspeita em 40% das imagens.

A evidência de osteófitos foi apontada em 4 animais (40%), com pontuação 3; projeção óssea proeminente, organizada e localizada, também foram identificadas discretas projeções ósseas entre as faces ósseas 10% (2) e também discreta projeção óssea localizada em uma das faces ósseas 20% (1).

10.3. Efusão Articular

Do total de 10 animais experimentais, 50% passaram a apresentar efusão articular após o tratamento com PPS, mais precisamente a partir do T14 em 40% dos animais e 10% dos animais em T21 (Figura 6). Este aumento de volume articular regrediu em 10% dos animais em T28, 20% dos animais em T30 e 20% em T60.

Figura 6. Gráfico das circunferências articulares.

10.4. Exames Hematológicos

Observou-se valores mais elevados de plaquetas nos animais que receberam o PPS (tratamento 2) em relação aos animais que receberam fenilbutazona (tratamento 1) ($p > 0,05$). Não foram observadas outras alterações hematológicas e de bioquímica sérica, no que se refere à função hepática e renal entre os tempos e entre os grupos experimentais.

10.5. Avaliação do Líquido Sinovial

O exame visual do LS realizado a cada coleta revelou pequena variação entre os tempos experimentais. Em T0 e T7 predominou a cor amarelo-palha em relação à média das cores avaliadas em D0. Já no Tempo T21 foi observado redução na viscosidade, diferente da melhor qualidade da viscosidade observada nos outros tempos

experimentais. O aspecto e a presença de coágulos e/ou fibrina não variaram durante os tempos, se mantendo, na média, como discretamente turvo e com presença de estrias de sangue, respectivamente.

Na análise citológica, observa-se um aumento na contagem de células mononucleadas grandes ($39\% \pm 13,7\%$) em T28, quando comparado a T0 ($14,44\% \pm 6,83\%$). Verifica-se redução de linfócitos em T28 ($32\% \pm 11,35\%$) em relação aos valores médios obtidos em T0 ($60,44\% \pm 14,31\%$), conforme podemos observar na Tabela 5. A contagem de hemácias também foi inferior em T28 ($30337 \pm 77386,63 \mu\text{l}$) que quando comparado ao T0 ($48602,22 \pm 90786,30 \mu\text{l}$), conforme apresentado na tabela 5. Houve elevação na concentração das proteínas totais em T28 ($1,2 \pm 0,5\text{g/dL}$), quando comparado ao T0 ($9,6 \pm 0,46 \text{g/dL}$). Nos demais tempos experimentais não foram observadas alterações significativa, entre tempos e entre grupos.

Figura 7. Gráfico da inspeção visual do LS.

Tabela 5. Média entre os tempos da avaliação Citológica do LS

		CONTAGENS TOTAIS DE CÉLULAS			CONTAGEM DIFERÊNCIAL DE CÉLULAS			
		PROTEÍNA (g/dL)	CÉLULAS NU- CLEADAS/ μ l	HEMÁCIAS/ μ l	NEUTRÓ- FILOS (%)	CÉLULAS MONONU- CLEARES GRANDES (%)	LINFÓCITOS (%)	EOSINÓ- FILOS (%)
T0	MÉDIA	0,98	120,11	48602,22	26	14,44	60,44	-
	DP	0,49	212,71	90786,30	11,26	6,83	14,31	-
T28	MÉDIA	1,28*	721*	30337*	25,1	39*	32*	-
	DP	0,40	657,03	77386,63	10,43	13,70	11,35	-

*diferença entre tempos ($p > 0,05$).

10.6. Interleucina-6

Os valores médios obtidos para os diferentes tempos estão apresentados na Figura 8. O valor médio para todos os tempos experimentais foi de $13,55 \pm 7,96$ pg/ml e valor máximo de 34,49 pg/ml (Tabela Suplementar 18). Foi possível verificar que ao término do tratamento 1 (D5), com fenilbutazona, o valor médio obtido para IL-6 em LS foi superior ao valor médio inicial (D0), sugestivo de que a fenilbutazona (IV, 4.4 mg/kg, a cada 24 horas, durante 5 dias) não foi suficiente para o controle da inflamação articular. No primeiro dia do tratamento 2 (T0; anteriormente à administração do PPS), a concentração de IL-6 no LS apresentou valor superior ao D0. No entanto, em T7, ou seja, segundo dia do tratamento 2, sete dias após a administração IA da PPS, os valores obtidos indicaram redução na concentração de IL-6, sendo que em T28 o valor médio de IL-6 IA também era inferior ao obtido em T0, o que reflete menor inflamação articular.

Analisando as concentrações médias de IL-6 entre os tempos e os grupos experimentais, verificou-se diferença estatística ($p>0.05$) entre o tratamento 2 e tratamento 1, sendo que as concentrações médias de IL-6 no tratamento 1 apresentaram-se maiores que as obtidas no tratamento 2. Houve diferença significativa ($p>0.05$) entre D0 e T14, D5 e T14 e T7 e T14 (Tabela 6).

Analisando alguns valores individualmente, verificou-se que os animais A9 e A10 apresentaram os valores mais altos para IL-6 em D0 (20,83 pg/ml e 24,15 pg/ml, respectivamente). O valor reduziu em D5 para 11,90 e 10,26 pg/ml após administração de fenilbutazona. Considerando D0 como o valor inicial do experimento, os valores encontrados ao término do experimento (T28) foram menores, sendo 9,72 e 11,65 pg/ml, respectivamente. Em T0, os valores obtidos por A9 e A10 foram de 33,31 e 18,42 pg/ml, sendo este tempo o primeiro dia do tratamento com PPS. Comparando-se T0 com T28, verifica-se uma redução considerável da citocina inflamatória IL-6, uma semana após o término das administrações IA de PPS.

Tabela 6. Concentração média de IL-6 entre os tempos e tratamentos

TEMPO	TRATAMENTOS	MÉDIA $\pm$ DP	MÉDIA $\pm$ DP
EXPERIMENTAL			
D0	TRATAMENTO 1	11,12 $\pm$ 6,10 ^{ns}	11,63 $\pm$ 4,97 ^{ns}
D5		12,13 $\pm$ 3,79 ^{ns}	
T0	TRATAMENTO 2	19,20 $\pm$ 7,61 ^b	15,78 $\pm$ 8,11 ^{ns}
T7		11,21 $\pm$ 2,86 ^a	
T14		21,76 $\pm$ 7,37 ^a	
T21		17,62 $\pm$ 7,76 ^b	

T28 $13,35 \pm 3,96^a$

T30 $13,34 \pm 11,00^c$

^{ns} = não significativo $p > 0.05$; Níveis de significância: ^a $p < 0.0001$; ^b $p < 0.001$; ^c $p < 0.05$

Verificou-se, em um animal (A8), um elevado valor de IL-6 em T21 (34,49 pg/ml). Porém, em T14 o valor de IL-6 era consideravelmente menor (8,34 pg/ml) e em T28 novamente um valor inferior ao observado em T21 (9,01 pg/ml). Demonstra-se, assim, provável processo inflamatório que se resolveu no período de sete dias, provavelmente não vinculado à administração de PPS.

Tabela 10. Valores das concentrações de ASA entre os tempos.

	D0	D5	T0	T7	T14	T21	T28	T30
A1	34,32	122,29	9,76	120,22	38,51	114,32	122,38	120,17
A2	122,62	125,5	27,02	125,5	80,71	117,86	72,66	120,9
A3	24,12	126,19	121,8	123,97	16,23	117,54	86,8	120,57
A4	50,4	122,54	5,33	51,96	53,13	106,88	94,17	104,27
A5	25,25	33,81	75,46	115,69	70,86	121,06	5,08	102,26
A6	124,3	3,79	121,63	119,2	117,86	120,57	78,88	128,17
A7	79,44	123,97	124,82	117,23	121,06	125,24	96,25	125,39
A8	12,82	69,73	121,96	119,2	123,21	104,01	119,28	126,07
A9	12,6	27,09	118,33	117,23	94,8	3,51	118,72	127
A10	102,58	118,57	30,93	119,2	122,87	122,38	119,44	118,89
Média	58,85	873,48	1129,4	1129,4	83,92	105,34	91,37	119,37
DP	42,37	46,40	49,27	20,53	36,72	34,53	33,59	8,62

Também, um animal (A2) apresentou o menor valor de IL-6 em D0 (6,85 pg/ml). Em D5 esse valor aumentou (16,37 pg/ml), mesmo após o tratamento com fenilbutazona. Em T0 o valor de 17,09 pg/ml passou por variações, sendo que em T28 apresentou o valor de 18,22 pg/ml.

Figura 8. Gráfico com a concentração média de IL-6 entre os animais nos diferentes tempos.

Tabela 7. Diferenças da concentração de IL-6 entre os tempos dos tratamentos.

Tempo	Média ± DP	Tempo	Média ± DP	Diff	p-valor
D0	11,12 ± 4,97	T14	21,76 ± 7,37	10,85	0.007 ^b
D5	12,13 ± 3,79	T14	21,76 ± 7,37	9,84	0.02 ^c
T14	21,76 ± 7,37	T7	11,21 ± 2,86	-11,46	0.003 ^b
T21	11,62 ± 7,76	T60	0,00	-17,54	0.0001 ^a

T28	13,35 ± 3,96	T60	0,00	-13,35	0.0003 ^a
T30	13.33 ± 11,00	T60	0,00	-13,33	0.0003 ^a

Níveis de significância: ^a p < 0.0001; ^b p < 0.001; ^c p < 0.05; Diff: diferença entre a média dos grupos.

Tabela 8. ANOVA entre os tempos, considerando todos os tempos.

Variáveis	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	F-valor	p-valor
Tempos	8	3171.6	9.82	2.08e-09 ***
Resíduo	80	3226.9		

Tabela 9. ANOVA entre os tempos, considerando dois tratamentos unindo D0 e D5 e todos os Ts (T0, T7, T14, T21, T28, T30 e T60).

Variáveis	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	F-valor	P-valor
Tempos	1	63.7	0.86	0.35 ^{ns}
Resíduo	87	3226.9		

10.4. Amilóide Sérico A (ASA)

A ASA apresentou valores médios para todos os tempos como 94,9 ng/ml (mínimo 3,51 e máximo 128,64 ng/ml; Desvio Padrão 40,05 ng/ml). Analisando os valores médios para as concentrações de ASA entre os tratamentos, foi possível observar diferença estatística ($p > 0,05$) entre o tratamento 2 e o tratamento 1, sendo que a concentração de ASA sinovial foi maior no tratamento 2 quando comparado com o tratamento 1. Houve diferença significativa na concentração de ASA sinovial durante o tratamento com o PPS ($p = 0.002$) entre todos os tempos experimentais, conforme demonstrado na Tabela 11.

Partindo de um valor médio de ASA em D0 de 58,89 ng/mL, a média dos valores para ASA entre os períodos experimentais foi de $34,98 \pm 39,52$ ng/ml para o grupo que recebeu fenilbutazona (D5) e $100,26 \pm 35,43$ ng/ml para o grupo que recebeu PPS (T0,7,14,21,28,30,60).

A concentração do ASA no líquido sinovial foi estatisticamente diferente entre os tratamentos ($p > 0,05$), demonstrando que dentro do período experimental o PPS apresenta um efeito anti-inflamatório da fenilbutazona e um efeito pró-inflamatório do PPS.

Tabela 11. Diferença entre as concentrações de ASA nos tempos experimentais.

Tempo	Média $\pm$ DP	Tempo	Média $\pm$ DP	Diff	p-valor
D0	58,83 $\pm$ 44,67	T7	112,54 $\pm$ 21,59	60.53	0.01 ^c
D0	58,83 $\pm$ 44,67	T30	119,36 $\pm$ 9,08	63.55	0.005 ^b
D5	87,34 $\pm$ 39,28	T60	122,39 $\pm$ 5,07	53.71	0.03 ^c
Trat.1	101,21 $\pm$ 35,43	Trat.2	78,11 $\pm$ 45,47		0,001 ^b

Níveis de significância: ^a $p < 0.0001$; ^b $p < 0.001$; ^c $p < 0.05$; Diff: diferença entre a média dos grupos.

Tabela 11. ANOVA entre os tempos, considerando todos os tempos.

Variáveis	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	F-valor	p-valor
Tempos	8	35908	3.40	0.002023 **
Resíduo	80	105304		

Tabela 12. ANOVA entre os tempos, considerando dois tratamentos unindo D0 e D5 e todos os Ts (T0, T7, T14, T21, T28, T30 e T60).

Variáveis	Grau de Liberdade	Soma dos	Quadra-	F-valor	p-valor
Tempos	1	12266		8.27	0.005052 **
Resíduo	87	128946			

Figura 9. Gráfico com a concentração média de ASA entre os animais nos diferentes tempos.

Figura 10. Gráfico da concentração média de ASA entre os tempos

Tabela 13. Concentração média entre os tempos e tratamentos para as concentrações de ASA.

TEMPO	TRATAMENTOS	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP
EXPERIMENTAL			
D0	TRATAMENTO 1	58,83 ± 44,67 ^a	73,08 ± 6,22 ^b
D5		87,34 ± 47,85 ^a	
T0	TRATAMENTO 2	75,70 ± 48,23 ^b	92,19 ± 6,88 ^a
T7		112,54 ± 48,72 ^c	
T14		83,92 ± 49,50 ^b	
T21		103,44 ± 48,39 ^c	

T28

91,36± 52,70^b

T30

119,36 ± 54,99^a

^{ns} = não significativo $p > 0.05$; Níveis de significância: ^a $p < 0.0001$; ^b $p < 0.001$; ^c $p < 0.05$

11. DISCUSSÃO

A osteoartrite (OA) em equinos é considerada uma das principais causas de queda de desempenho e possui preocupação especial em equinos (SCHLUETER & ORTH, 2004). O diagnóstico da OA em equinos pode ser obtido por meio das alterações clínicas e, principalmente pelos achados radiográficos, o que em muitas vezes ocorre de maneira tardia. Para tanto, faz-se necessário o conhecimento dos fatores predisponentes para o desenvolvimento da OA, sendo o tipo de atividade física um dos fatores de grande relevância (BACCARIN et al., 2012).

Estudos como os de Trotter et al., (1989), Riggs, Whitehouse e Boyde (1999) e Kawcak et al (2010) indicam que a OA pode ocorrer cedo em equinos atletas jovens ou, tardiamente, em equinos idosos. Baccarin e colaboradores (2012) demonstraram que, em um período de 10 anos de investigação, 146 cavalos de um total de 2872 animais, apresentaram OA, sendo que 95% eram animais atletas, sendo o principal sintoma observado a queda de desempenho ou claudicação. Neste estudo, os animais utilizados eram provenientes dos biotérios das instituições de ensino, tendo sido doados por questões financeiras, uma vez que não poderiam mais ser utilizados para esporte ou devido ao custo do tratamento.

Independentemente da causa específica, a lesão inicial na OA é, geralmente, de natureza mecânica, com um desequilíbrio entre a carga aplicada e a capacidade dos tecidos de suportar essa carga (ROSE & HODGSON, 1994). Trauma à articulação, imobilização da articulação, má conformação, ferrageamento incorreto, são frequentemente fatores preliminares que contribuem para o aparecimento de OA no cavalo (SCHLUETER & ORTH, 2004). Da mesma forma, a ocorrência de doença articular espontânea é um problema clínico comum em cavalos (CARON, 2011;

MCILWRAITH, FRISBIE & KAWCAK, 2012). Mcilwraith e colaboradores (2012) demonstraram que a articulação metacarpofalangeana é a mais susceptível à ocorrência de OA, por ser uma articulação que apresenta grande mobilidade e que recebe grandes cargas durante uma corrida. No presente estudo, trabalhou-se com animais aposentados de suas atividades anteriores devido à OA, sendo que 70% (7/10) apresentavam lesões envolvendo a articulação metacarpofalangeana.

Uma das principais alterações clínicas observadas em equinos com OA é a claudicação, que é uma preocupação particular em cavalos porque seu valor está intimamente ligado à sua consistência (SCHLUETER & ORTH, 2004). Neste estudo, o grau de claudicação mais frequentemente observado foi o grau 1/4, considerado como claudicação leve. Tnibar et al. (2015) verificaram porcentagem maior para uma claudicação considerada como moderada (3/4) em 35% dos animais, 2/4 em 32% dos animais, 1/5 em 22% dos animais e 4/4 em 7% dos animais, valores esses que diferem dos obtidos nesta pesquisa, sendo 0/4 para 27% dos animais, 1/4 para 53% dos animais, 2/4 para 7% dos animais, 3/4 para 7% dos animais e 4/4 para 6% dos animais.

A claudicação é sem sombra de dúvida um dos mais importantes problemas médicos dos equinos, no entanto, poucos cavalos morrem ou sofrem eutanásia por conta da claudicação e uma considerável porcentagem se recupera dessa condição. Para um diagnóstico e tratamento preciso, evidências devem ser reunidas visando critérios de diagnóstico claros e mensuráveis, começando com a capacidade de detectar e quantificar definitivamente a claudicação (KEEGAN, 2007). Em um estudo conduzido por Pleasant e colaboradores (1997) foi utilizada a filmagem dos animais, sendo observado o movimento de frente, de costas e com vista lateral, assim como realizado neste estudo. Reportou-se uma correlação de 100% entre 4 observadores diferentes.

Outro estudo, utilizando filmagens pela vista lateral de 24 cavalos trotando em uma esteira, apresentou concordância entre 6 especialistas, sendo as claudicações brandas a moderadas (KEEGAN et al., 1998; KEEGAN, 2007). Neste estudo, utiliza-

mos um total de 540 filmagens (frente, costas e lateral ao passo, trote e ao trote flexionado) dos 10 animais do experimento, considerando-se todos os tempos experimentais. Essas imagens foram avaliadas por 4 observadores externos e um observador interno, todos com experiência comprovada na área. A correlação entre os avaliadores para o grau de claudicação (com ou sem flexão) e para o membro afetado foi unânime na maioria dos casos, sendo de 100% para os escores de claudicação nos testes sem flexão e 91% para o membro afetado, nos testes com flexão.

Durante as avaliações neste projeto de pesquisa, o grau de claudicação mais observado, sem flexão e pós-flexão, foi o grau 1/4 (54,4% para os avaliadores e 53,3% para o autor). Sabe-se que avaliadores experientes conseguem definir melhor claudicações severas (KEEGAN, 2007). Os testes de flexão e a provável resposta em equinos isentos de claudicação há muito tempo são debatidos, devido às técnicas variáveis utilizadas, à duração da flexão e a força aplicada durante a flexão e a potencial variabilidade cavalo-a-cavalo e dia-a-dia nas respostas (KEG et al., 1997; STARKE et al., 2012). Pelo fato do presente estudo ter sido realizado em duas diferentes instituições, os testes de claudicação foram realizados em diferentes dias, o que pode ter contribuído com as diferenças de correlação de concordância dos resultados do trote sem flexão e do trote com flexão. Sabe-se que o trote pós-flexão pode auxiliar a identificação da fonte de dor (ROSS, 2010), entretanto o presente trabalho trouxe uma correlação menor de concordância quanto ao grau de claudicação, no teste sem flexão e quanto a qual membro afetado, no teste com flexão, sendo 92% e 91%, respectivamente.

McIlwraith (1996) relata que a dor articular pode ser detectada realizando-se o teste de flexão articular. Garcia et al (2009) constataram que somente 16% dos potros que apresentavam alterações radiográficas de OA foram positivos ao teste de flexão articular. Baccarin et al (2012) indicam que esta falta de sensibilidade do teste também foi observada por Maranhão et al (2006) e Kawcak et al (2008), os quais observaram aumento na resposta ao teste de flexão articular em articulações saudáveis de cavalos após serem exercitados em esteira por 91 dias. Neste estudo, 30% dos animais que compuseram o experimento não apresentaram claudicação no momento do

exame (D0) somente quando realizamos o teste de flexão forçada, porém apresentaram alterações radiográficas, corroborando como o observado por Baccarin et al. (2012) e por esse motivo os animais foram inseridos no experimento. Todos os animais apresentavam achados radiográficos compatíveis com OA em alguma das articulações, porém apenas 70% apresentaram claudicação. Sendo assim, a avaliação radiográfica mostra-se fundamental para o diagnóstico da OA, em equinos.

Os achados radiográficos que são característicos das osteoartrites incluem diminuição ou perda do espaço articular, esclerose do osso subcondral, formação de osteófitos marginais, proliferação óssea periosteal e eventualmente o desenvolvimento de anquilose (BJÖRNSDÓTTIR et al., 2000; SMITH, 1996; MAY, 1996). Indo ao encontro destas informações, foram encontrados no presente trabalho, diminuição da interlinha radiográfica em 30% das imagens radiográficas, presença de osteófitos marginais em 40%, além de aumento de volume dos tecidos moles por pequeno aumento tecidual difuso em 50% e suspeita de mineralização dos tecidos moles em 60% dos exames.

O PPS vem sendo clinicamente utilizada em equinos na dose de 2-5 mg/kg por via intramuscular (IM), intravenosa (IV) ou intra-articular (IA), sendo recomendada por apresentar efeitos benéficos, particularmente em casos de OA com múltiplas articulações envolvidas (LITTLE & GOSH, 1993). Kramer et al. (2014) realizou uma pesquisa com cerca de 220 médicos veterinários de equinos da Austrália e todos os entrevistados utilizam PPS como um agente profilático ou para o tratamento da OA. Os entrevistados administraram mais frequentemente o PPS, via intramuscular (IM), como agente profilático antes das competições próximas (80,3%) do que para o tratamento de qualquer classe de OA. Poucos dos entrevistados optam por usar as vias de administração IV ou IA. A maioria escolhe administrar PPS na dose de 3 mg/kg, IM, semanalmente, por 4 semanas, seguido de injeções mensais como terapia profilática e para tratamento de todas as classes de OA.

Por sua vez, em um estudo com equinos, utilizando o modelo de OA de fragmento osteocondral, McIlwraith, Frisbie e Kawcak (2012) indicaram que a utilização

de PPS na dose de 3mg/kg, semanalmente, durante 4 semanas, não apresentou efeitos sob a claudicação e efusão sinovial, no entanto, houve efeitos benéficos na fibração da cartilagem e nas concentrações de sulfato de condroitina 846 (CS 846) no líquido sinovial. Sendo assim, os pesquisadores propuseram que a maioria dos efeitos modificadores do PPS na doença articular primária ocorre no nível osteocondral, em vez de ter um efeito direto na redução da claudicação. Neste estudo, em que se utilizou a dose de 125 mg por articulação, a cada 7 dias, repetindo-se 4 aplicações, na literatura consultada apenas um trabalho utilizou o PPS por via IA (KWAN et al., 2012), com doses e frequências de administrações diferentes, além de o fármaco não ter sido administrado isoladamente, este foi associado ao glicosaminoglicano, por esse motivo em concordância com a equipe de pesquisa e desenvolvimento (XXXXXX) utilizamos a dose e frequência recomendada pelo fabricante (XXXXX), verificou-se quando analisando somente a claudicação, principalmente a claudicação após a flexão forçada, que o tratamento com PPS IA resultou em menor grau de claudicação dos animais, quando comparado com o tratamento com fenilbutazona.

A sinovite é caracterizada por derrame articular e diminuição da amplitude de movimento. A dor é gerada quando estímulos térmicos, químicos e mecânicos na articulação ativam as fibras aferentes periféricas (HALL et al., 2001). A interação entre a sinóvia e a cartilagem articular é complexa, sendo que evidências *in vitro* e *in vivo* sugerem que alterações estruturais e funcionais nos tecidos articulares afetam intimamente os outros tecidos da articulação (SNYDERMAN, 1986). Estudos indicam que a liberação de proteases com atividades degradantes é responsável por danificar a cartilagem articular (SAKLATVALA, 1986). A secreção dessas proteases é induzida por várias citocinas produzidas localmente por macrófagos e células sinoviais (DAYER et al., 1985). Pozzobon et al. (2008) em um trabalho conduzido com pôneis e sinovite induzida, observou aumento significativo no diâmetro articular 12 horas após a indução, que se manteve até 120 horas (término do experimento), diferente do grupo tratamento (que recebeu a administração de parecoxib) e passou a diminuir a partir de 48 horas após indução.

No presente trabalho, os animais em estudo não apresentavam aumento de volume articular no início do experimento até T0, sendo hipotetizado que a sinovite

tenha sido induzida a partir da administração do PPS. Verificou-se que houve aumento de volume articular em 50% dos animais após a administração intra-articular do fármaco, sendo que esse aumento apresentou regressão em tempos diferentes. 20% dos animais apresentaram regressão do aumento de volume articular em T30 e T60 e 10% em T28. O mesmo foi observado em equídeos por Francoz, Derochers e Latouche (2007) em bovinos e por Kwan e colaboradores (2012) em equídeos, os quais sugerem que a PPS e Glucosamina (PPS-GLC) induzem sinovite química leve, além de resposta inflamatória associada à artrocentese repetida e à administração de solução salina isolada. Além disso, ressalta-se o risco de hemartrose após a administração intra-articular de PPS-GLC (KWAN et al., 2012), sendo aconselhável não exercitar cavalos por pelo menos 24 horas após a administração IA dos fármacos (DART et al., 2001). Neste estudo, nenhum animal foi exercitado após as administrações de PPS e não foi observada hemartrose.

A análise de fluidos sinoviais patológicos se torna significativa à luz de um entendimento fundamental das propriedades fisiológicas dos fluidos sinoviais normais (VAN PELT, 1967). No presente trabalho, em relação ao aspecto do líquido sinovial, os resultados mais frequentemente observados foram o de discretamente turvo, sendo relatado por McIlwraith e Trotter (1996) e Pozzobon et al (2009) que a turvação do LS é causada pela elevação na concentração de proteína e pelo aumento da celularidade. Como foi observado, neste estudo, elevação da concentração de proteínas totais em T28, quando comparado a T0, contudo foi avaliado aspecto levemente turvo em todos os tempos experimentais. Quanto à citologia, neutrófilos e células mononucleares são observadas no líquido sinovial sadio, mas a porcentagem de neutrófilos normalmente é inferior a 10% (McILWRAITH & TROTTER, 1996). Mahaffey (1992) apresentou em uma pesquisa, que os neutrófilos são geralmente as células predominantes no LS de cavalos com doença inflamatória, sendo os linfócitos as células que apresentaram variação entre tempos.

A porcentagem média de linfócitos observadas no trabalho conduzido utilizando pôneis com sinovite induzida, por Pozzobon et al. (2009) foi de 15,9% e 1,2% (entre os tempos, D0 e D28), o que foi considerado como fisiológico pelo autor. O mesmo foi atestado por Mahaffey (1992), que demonstrou uma variação de linfócitos

de $58 \pm 15\%$ em D0 e $43 \pm 17\%$ em T28, valor significativamente mais elevado que o dos autores anteriormente citados. Foi relatado por Mahaffey (1992) que os linfócitos raramente fornecem informação diagnóstica útil, e a sinovite linfocítica é rara em equinos. Neste estudo verificou-se elevação das células mononucleares grandes em T28, quando comparado a T0, com redução de linfócitos na porcentagem de 28,44%. De acordo com a literatura, hipotetiza-se que a administração de PPS IA tenha causado certo grau de sinovite nos equinos. Não foram observadas alterações hematológicas e em função hepática e renal, o que sugere que a administração repetida de PPS IA não apresenta efeitos deletérios sistêmicos.

As hemácias não são consideradas constituintes normais do líquido sinovial, sendo muitas vezes relacionadas à contaminação no momento da coleta (McILWRAITH & TROTTER, 1996). A hemartrose é reconhecida como uma importante causa de dor, tanto em humanos, como em equinos (JEAN-BAPTISTE & De CEULAER, 2000; PONCIA & RYAN, 1999; DYSON, 1986; KAWAMURA et al., 1994). Nos cavalos, um dos sinais de dor associados a hemartrose é a claudicação intermitente, considerada um problema clínico (DYSON, 1986; JUDY & GALUPPO, 2005). Neste estudo, a contagem de hemácias no LS dos animais em T0 foi maior que o valor encontrado em T28, o que sugere que não houve hemartrose ao longo do período experimental.

Gosh (1999) indica que no líquido sinovial de pacientes com OA há presença de mediadores inflamatórios e outros marcadores de ativação de células imunes. A interleucina 6, é uma citocina pleiotrópica que desempenha uma gama de funções nos efeitos imunes celulares e humorais, possuindo direta relação com processos inflamatórios (FRANCISCO, et al., 2006). Magali et al. (2013) em um estudo no qual mensuraram citocinas no líquido sinovial da articulação do jarrete de cavalos de salto, com idades que variaram de 2 a 15 anos, divididos em grupos sem sinal de doença articular e com sinal de doença articular, porém caracterizada como não ativa e um grupo com sinal de doença articular ativa e que passaram por tratamento, apresentou valores para IL-6 como: $112,20 \pm 90,01$ (16,43 pg/ml), $185,04 \pm 149,87$ (17,66 pg/ml), $263,83 \pm 292,24$ (63,77 pg/ml) e $106,33 \pm 72,35$ (18,68 pg/ml), respectivamente.

Partindo da premissa que a IL-6 participa da degradação da cartilagem como demonstram Brenner et al (2003), Goekoop et al (2010) e Valdes et al (2010), os resultados referentes à IL-6 no presente trabalho sugerem que o tratamento com PPS IA promoveu aumento da inflamação sinovial, uma vez que os valores de IL-6 do tratamento 2 (PPS IA) foram maiores que os do tratamento 1 (fenilbutazona), esse fato chamou a atenção dos envolvidos uma vez que não se pode apontar o agente causador, não podemos afirmar com certeza que as infiltrações articulares realizadas semanalmente por si só, tenham sido as responsáveis pelo aumento das citocinas no LS ou o PPS Valdas e colaboradores (1989) utilizando a fosfolipase A₂ por via IA de maneira seriada, demonstrou significativas mudanças proliferativas e inflamatórias na articulação de humanos, Hunt et al (2019) utilizando um modelo de artrite induzida pela administração de lipolissacarídeos, indicou que injeções IA não tiveram influencia na expressão de IL-1 β ou IL-6 pelos leucócitos em circulação, indicando que a administração IA não provoque insulto suficiente para causar inflamação sistêmica.

Verificou-se que os animais em estudo apresentavam doença articular degenerativa, com valores para IL-6 em LS inferiores ao observado por Magali et al (2013), porém indicativo de degradação da cartilagem articular. Um dos animais (A2) apresentou o menor valor para IL-6 no primeiro dia de experimento (D0). Esse valor aumentou após o tratamento com fenilbutazona e com PPS, porém a claudicação apresentou um grau menor após o tratamento com PPS (T30 e T60), diferente do grau observado em D5. Analisando os valores de concentração animal/dia o animal A4 apresentou uma variação interessante nas concentrações de IL-6, em D0 a concentração era de 8,34 pg/ml (D5 12,02 pg/ml, T0 8,06 pg/ml, T7 8,72 pg/ml) e em T14 30,73 pg/ml e em T21 12,28 pg/ml, apresentando uma variação entre os tempos, esse fato de a concentração de IL-6 ter alterado durante o tratamento com PPS pode ser explicado pela indução transitória da sinovite pelo pentosan (KWAN et al., 2012).

O ASA é classificado como uma proteína de fase aguda, relacionada frequentemente a processos inflamatórios infecciosos, sendo produzida através do estímulo pela IL-6. Um nível normal, indetectável, de ASA no plasma sanguíneo, provavel-

mente exclui muitas condições patológicas graves, especialmente infecções significativas, enquanto um valor elevado é uma evidência inequívoca de doença orgânica (PEPYS et al., 1989). Neste estudo, nenhum animal apresentou valor 0 para ASA IA e tão pouco para IL-6. Em um estudo conduzido por Jacobsen, Thomsen e Nanni (2006), a análise do ASA em 89 amostras de líquido sinovial (articular e de bainha) apresentou um valor médio abaixo do limiar de detecção 0,48 mg/L. Os valor médio do ASA neste estudo, em D0, foi de 0,06 mg/L (convertido para fazer sentido junto ao trabalho supracitado 58,89 ng/mL). Em um estudo conduzido por Sanchez Teran e colaboradores (2012) após administrações repetidas de amicacina por via intra-articular, o valor identificado foi 18,42 mg/L. Neste projeto de pesquisa, o fármaco utilizado não foi um antibiótico e, apesar das múltiplas punções articulares, o valor (0,07 mg/L [69,20 ng/ml]) foi inferior ao valor observado no trabalho com administração de amicacina.

Artrocenteses repetidas, com ou sem a administração intra-articular de amicacina, não causaram estímulo inflamatório suficiente para induzir a síntese de ASA (JACOBSEN et al., 2006). Em seres humanos, a concentração do amiloide A sérico se eleva mais em resposta a estímulo bacteriano do que pela infecção viral ou por outros processos inflamatórios (MALLE & DE BEER, 1996). O ASA no soro sanguíneo possui uma meia vida muito curta, nos ratos ela é de 75-80 min e 95% é eliminado do plasma 6 horas após a síntese ter terminado (32). Hoffman e Benditt (1983) e Uhar e Whitehead (1999) apresentam que os níveis em roedores de laboratório variam de 30 minutos a 2 horas e os níveis plasmáticos de ASA diminuem logo após o término da síntese (JACOBSEN & ANDERSEN, 2007). A meia vida do ASA no líquido sinovial de equinos não foi reportada ainda, porém artrocenteses repetidas a cada 4 horas, combinadas com injeções intra-articulares de solução salina, não aumentaram as concentrações de ASA no LS (JACOBSEN, THOMSEN & NANNI, 2006). O presente estudo realizou múltiplas injeções IA, contudo o intervalo entre uma punção articular e outra foi longo, 168 horas, e as amostras obtidas eram colhidas antes da administração do PPS.

O'hara et al. (2004) investigou em humanos a indução de matriz metaloproteinases (MMPs) por ASA-A no cenário da inflamação. Foi demonstrado que o ASA-A

estimula a produção de MMP-1 e MMP-3 por Sinoviócitos-tipo fibroblasto (FLS). Nas condições experimentais empregadas, o ASA-A aumentou a produção de MMP-1 (colagenase intersticial) em uma média de 2,5 vezes e aumentou a produção de MMP-3 (estromelisina 1) em aproximadamente 9 vezes.

Neste sentido, o presente estudo não investigou os níveis de MMP no líquido sinovial de equinos, porém baseados no estudo de O'hara et al (2004), pode-se supor que de acordo com a elevação das concentrações de ASA, os níveis de MMP (1 e 3) deveriam estar altos. Em D5 (97,39 ng/ml) foi identificado nível mais alto na concentração de ASA do que o observado em T14 (83,92 ng/ml), sendo importante lembrar que em D0 os valores encontrados eram de $58,83 \pm 44,67$ ng/ml e em T0 $75,70 \pm 51,94$ ng/mL. Ou seja, cinco dias após o tratamento com fenilbutazona, o mediador inflamatório ASA se elevou e, no terceiro dia de tratamento com PPS (sete dias após a segunda administração de PPS) o valor médio foi $112,55 \pm 21,59$ ng/mL demonstrando aumento em comparação ao D0. Ao comparar O tratamento 1 e o tratamento 2 percebemos uma diferença entre os tratamentos, analisando os mediadores inflamatórios, o período experimental e as manobras experimentais foram muito menores no tratamento 1, que no tratamento 2, também o fato de utilizarmos os mesmos animais e consequentemente as mesmas articulações influenciaram os resultados. Porém analisando os animais dentro do mesmo grupo de tratamento, a concentração média para o ASA em T0 foi de $75,70 \pm 51,94$ ng/mL em T7 $112,55 \pm 21,59$ ng/mL demonstrando aumento, porém em T28 o valor médio foi de $91,36 \pm 35,40$ ng/mL o que demonstra um efeito positivo do PPS.

Existem muitos estudos que avaliaram os efeitos do PPS, administrado por via intramuscular em equinos (FULLER, GHOSH & BARR, 2010; McILWRAITH et al., 2012; ELMESIRY et al., 2016), porém poucos avaliaram os efeitos após administração intra-articular (KWAN et al., 2012). Pesquisas que tenham avaliado, em equinos, os efeitos do PPS sob mediadores inflamatórios no líquido sinovial e ou plasma são ainda mais escassos, o que sugere a necessidade de mais trabalhos nesta linha de pesquisa, envolvendo grupos experimentais com maior quantidade de animais que o realizado no presente estudo.

12. CONCLUSÃO

Analisando os efeitos do PPS administrado por via intra-articular em equinos, é possível concluir que o fármaco auxilia os animais acometidos por osteoartrite, quanto à redução do grau de claudicação e a concentração de mediadores inflamatórios IL-6 e ASA.

Verificou-se que a administração repetida de PPS através de IA promove certo grau de sinovite, com aumento reversível da efusão sinovial e elevação da celularidade em líquido sinovial, embora não tenha efeitos prejudiciais sistêmicos.

REFERENCIAS

ADAMOPOULOS, I. E., et al. "Stimulation of Osteoclast Formation by Inflammatory Synovial Fluid." **Virchows Archiv**, vol. 449, no. 1, 2006, pp. 69–77.

ADAMS, O.R.A, & STASHAK. T.S. Adams' Lameness in Horses. **Williams & Wilkins**, 2002.

ALVES, A. L. G. "Ultra-Sonografia Diagnóstica Do Sistema Locomotor Eqüino." **Revista De Educação Continuada Em Medicina Veterinária e Zootecnia Do CRMV-SP**, vol. 1, no. 1, 1998, pp. 31–35.

AMIN, A. R., & STEVEN B. A. "The Role of Nitric Oxide in Articular Cartilage Break-down in Osteoarthritis." **Current Opinion in Rheumatology**, vol. 10, no. 3, 1998, pp. 263–268.

ARICAN, M. HANIFI, E. U.SAIT, U. ÖZNUR, K. "Diagnostic techniques for the carpal and fetlock joints in horses with arthritis." **Med. Weter.** v. 75(11), 2019, pp.693-698.

AUER, J.A; STICK, J.A. "Osteochondrosis" **Equine Surgery**, 4ed. **Sauders Company**, 2012, pp. 1239-1251.

BACCARIN, R. Y. A, et al. "Relação Entre Exame Clínico e Radiográfico No Diagnóstico Da Osteoartrite Equina." **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol. 49, no. 1, 2012, p. 73.

BALAZS, E. A., et al. "Nomenclature of Hyaluronic Acid." **Biochemical Journal**, vol. 235, no. 3, 1986, pp. 903–903.

BARNABÉ, P.A., et al. "Características Físico-Químicas e Citológicas Do Líquido Sinovial Da Bainha Tendínea Digital De Eqüinos." **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 57, no. 3, 2005, pp. 288–294.

BARROWCLIFFE, T, et al. "Anticoagulant Activities of Pentosan Polysulphate (Hémoclar) Due to Release of Hepatic Triglyceride Lipase (HTGL)." **Thrombosis and Haemostasis**, vol. 56, no. 02, 1986, pp. 202–206.

BENITO, M J. "Synovial Tissue Inflammation in Early and Late Osteoarthritis." **Annals of the Rheumatic Diseases**, vol. 64, no. 9, 2005, pp. 1263–1267.

BERTONE, A. L., et al. "Synovial Fluid Cytokines and Eicosanoids as Markers of Joint Disease in Horses." **Veterinary Surgery**, vol. 30, no. 6, 2001, pp. 528–538.

BILLINGHURST, R. C., et al. "Induction of Intra-Articular Tumour Necrosis Factor during Acute Inflammatory Responses in Equine Arthritis." **Equine Veterinary Journal**, vol. 27, no. 3, 1995, pp. 208–216.

BJÖRNSDÓTTIR, S. et al., "Radiographic and clinical survey of degenerative joint disease in the distal tarsal joints in Icelandic horses." **Equine Vet. Journal.** v. 36. 2000. pp. 5-11.

BLACK, S. "Cardioprotective Effects of Heparin or N-Acetylheparin in an in Vivo Model of Myocardial Ischaemic and Reperfusion Injury." **Cardiovascular Research**, vol. 29, no. 5, 1995, pp. 629–636.

BRENNER, S. S., et al. "Osteoarthritis of the Knee – Clinical Assessments and Inflammatory markers11Supported by a Grant from the Robert Bosch Stiftung, Stuttgart, Germany." **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 12, no. 6, 2004, pp. 469–475.

BROECKX, S. Y., et al. "The Use of Equine Chondrogenic-Induced Mesenchymal Stem Cells as a Treatment for Osteoarthritis: A Randomised, Double-Blinded, Placebo-Controlled Proof-of-Concept Study." **Equine Veterinary Journal**, vol. 51, no. 6, 2019, pp. 787–794.

BROMMER, H., BRAMA, P.A.J., BARNEVELD, A., VAN WEEREN, P.R. Differences in the topographical distribution of articular cartilage degeneration between the equine metacarpo- and metatarsophalangeal joints. **Equine vet. J.** 36, 2004, pp. 506-510.a.

BROMMER, H., VAN WEEREN, P.R. and Brama, P.A.J. New approach for quantitative assessment of articular cartilage degeneration in horses with osteoarthritis. **Am. J. vet. Res.** 64, 2003, pp. 83-87.b.

BUCKWALTER, J.A. "Articular Cartilage: Injuries and Potential for Healing". **Journal of Orthopaedic and Sports physical therapy** v. 28(4), 1998, pp. 192-202.

BUCKWALTER, J.A, MANKIN, H.J, GRODZINSKY, A.J, "Articular cartilage and osteoarthritis". **AAOS Inst. Course Lectures** v.54, 2005, pp. 465-480.

CANTLEY, C. E. L., et al. "Naturally Occurring Osteoarthritis in the Metacarpophalangeal Joints of Wild Horses." **Equine Veterinary Journal**, vol. 31, no. 1, 1999, pp. 73–81.

CARON, J.P. "Osteoarthritis" In.: Ross, M.W. , Dyson, S.J. eds. **"Diagnosis and management of lameness in the horse" 2nd edition**. St. Louis Elsevier Saunders, 2003, p. 655-668.

CHU, C.R, ANDRIACHII, T.P. "Dance between biology, mechanics, and structure: A systems-based approach to developing osteoarthritis prevention strategies". **J Orthop Res.** v.33(7), 2015, pp. 939-947.

CLEGG, et al. "The Effect of Drugs Commonly Used in the Treatment of Equine Articular Disorders on the Activity of Equine Matrix Metalloproteinase-2 and 9." **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, vol. 21, no. 5, 1998, pp. 406–413.

CLYNE, M. J. "Pathogenesis of Degenerative Joint Disease." **Equine Veterinary Journal**, vol. 19, no. 1, 1987, pp. 15–18.

DAYER, J.M. et al., "Type IX collagen is a potent inducer of PGF₂ and interleukin 1 production by human monocyte macrophages." **FEBS Lett.** V.198. 1985. pp. 208-222.

DART, A.J. et al., "The effect of three different doses of sodium pentosan polysulphate on haematological and haemosttic variables in adult horses." **Aus. Vet. J.** v.79.n.9. 2001 pp. 624-627.

de GRAWN, J.C. "Molecular monitoring of equine joint homeostasis". **Vet Q** . v.31(2), 2011, pp.77-86.

DYSON, S. "Lameness associated with recurrent haemarthrosis in horse." **Equine Vet. J.** v. 18, 1986, pp. 224-226.

ECKER, E. E., & GROSS. P. "Anticomplementary Power of Heparin." **Journal of Infectious Diseases**, vol. 44, no. 3, 1929, pp. 250–253.

ECKERSALL, P.D. "Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals" **Revue Med. Vet.** v. 151(7), 2000, pp.577-584.

ENGELBERG, H. "Evidence That Endogenous Heparin Activity Deficiency May Be an Important Factor in Atherogenesis." **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, vol. 23, no. 02, 1997, pp. 159–166.

ERIKSEN, N., & BENDITT E.P. "Isolation and Characterization of the Amyloid-Related Apoprotein (SAA) from Human High Density Lipoprotein." **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 77, no. 11, 1980, pp. 6860–6864.

FERRIS, D.J., FRISBIE, D.D., McILWRAITH, C.W. and KAWCAK, C.E. Current joint therapy usage in equine practice: a survey of veterinarians 2009. **Equine Vet. J.** 43, 2011, PP. 530-535.

FIORITO, S., et al. "Inflammatory Status and Cartilage Regenerative Potential of Synovial Fibroblasts from Patients with Osteoarthritis and Chondropathy." **Rheumatology**, vol. 44, no. 2, 2004, pp. 164–171.

FOTOPOULOS, V. C, et al. "Expression Levels of Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 and Its Specific Inhibitor TIMP-1, in Septic and Aseptic Arthritis of the Knee." **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, vol. 20, no. 6, 2012, pp. 1159–1167.

FOX, K. "The ENACT Study: a Pan-European Survey of Acute Coronary Syndromes." **European Heart Journal**, vol. 21, no. 17, 2000, pp. 1440–1449.

FOX, A.J.S, ASHEESH, B, RODEO, S.A. "The Basic Science of Articular Cartilage Structure, Composition, and Function" **Sports Health** v. 1(6), 2009, pp. 461-468.

FRANCIS, D. J., et al. "Retardation of Articular Cartilage Degradation by Glycosaminoglycan Polysulfate, Pentosan Polysulfate, and DH-40J in the Rat Air Pouch Model." **Arthritis & Rheumatism**, vol. 32, no. 5, 1989, pp. 608–616.

FRANCOZ, D, DESROCHERS, A. LATOUCHE, J.S., "Effect of repeated arthrocentesis and single joint lavage on cytologic evaluation of synovial fluid in 5 young calves." **Can. J. Vet. Res.** v. 71n.2. 2007 pp. 129-134.

FREAN, S. P., et al. "Effects of Anti-Arthritic Drugs on Proteoglycan Synthesis by Equine Cartilage." **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, vol. 25, no. 4, 2002, pp. 289–298.

FRISBIE, D.D, MORISSET, S, HO, C.P, et al. Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. **Am J Sports Med** v. 34, 2006, pp.1824–1831.

FRISBIE, D. D. Hyaluronan. In: McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE, van Weeren RP, editors. **Joint disease in the horse**. 2nd ed. St. Louis: Elsevier; 2016. p. 215-219.

FULLER, C. J., et al. "Plasma and Synovial Fluid Concentrations of Calcium Pentosan Polysulphate Achieved in the Horse Following Intramuscular Injection." **Equine Veterinary Journal**, vol. 34, no. 1, 2010, pp. 61–64.

FULLER, C.J., et al. "Cross-Sectional Comparison of Synovial Fluid Biochemical Markers in Equine Osteoarthritis and the Correlation of These Markers with Articular Cartilage Damage." **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 9, no. 1, 2001, pp. 49–55.

GARCIA, R.S. et al., "Clinical and radiology study of juvenile tarsal osteoarthritis in Mangalarga Marchador bred foals." **Ciência Animal Brasileira**, v. 10;n.1. 2009 pp. 254-260.

GHOSH, P., et al. "Animal Models of Early Osteoarthritis: Their Use for the Evaluation of Potential Chondroprotective Agents." **Joint Destruction in Arthritis and Osteoarthritis**, 1993, pp. 195–206.

GHOSH, P. & NONGPORN H. "Interactions of Pentosan Polysulfate with Cartilage Matrix Proteins and Synovial Fibroblasts Derived from Patients with Osteoarthritis." **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 4, no. 1, 1996, pp. 43–53.

GHOSH, P. "The Pathobiology of Osteoarthritis and the Rationale for the Use of Pentosan Polysulfate for Its Treatment." **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, vol. 28, no. 4, 1999, pp. 211–267.

GOEKOOP, R.J., et al. "Low Innate Production of Interleukin-1 β and Interleukin-6 Is Associated with the Absence of Osteoarthritis in Old Age." **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 18, no. 7, 2010, pp. 942–947.

GOLDRING, M.B, MARCU, K.B. "Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases". **Arthritis Res Ther.** v.11(3), 2009, pp.224.

GOODRICH, L. R., & NIXON A.J. "Medical Treatment of Osteoarthritis in the Horse – A Review." **The Veterinary Journal**, vol. 171, no. 1, 2006, pp. 51–69.

GRALINSKI, M. R., et al. "Selective Inhibition of the Alternative Complement Pathway by sCR1[DesLHR-a] Protects the Rabbit Isolated Heart from Human Complement-Mediated Damage." **Immunopharmacology**, vol. 34, no. 2-3, 1996, pp. 79–88.

HALL, G.S. et al., "Case of synovitis potentially caused by *Dolosigranulum pigrum*" **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39n.03. 2001, pp. 1202-1203.

HEINRICH, P C, et al. "Interleukin-6 and the Acute Phase Response." **Biochemical Journal**, vol. 265, no. 3, 1990, pp. 621–636.

HERRERO, L. J., et al. "Pentosan Polysulfate: a Novel Glycosaminoglycan-Like Molecule for Effective Treatment of Alphavirus-Induced Cartilage Destruction and Inflammatory Disease." **Journal of Virology**, vol. 89, no. 15, 2015, pp. 8063–8076.

HOFFMAN, J.S, BENDITT, P.E. " Amyloid-related high density lipoprotein apoprotein, serum amyloid protein (ApoSAA), in the mouse." **J. Clin. Invest.** V.71. 1983 pp. 926-934.

HULTÉN, C., et al. "Dynamics in Serum of the Inflammatory Markers Serum Amyloid A (SAA), Haptoglobin, Fibrinogen and α 2-Globulins during Induced Noninfectious Arthritis in the Horse." **Equine Veterinary Journal**, vol. 34, no. 7, 2002, pp. 699–704.

HUSBY, G., et al. "Serum Amyloid A (SAA): Biochemistry, Genetics and the Pathogenesis of AA Amyloidosis." *Amyloid*, vol. 1, no. 2, 1994, pp. 119–137.

HUSEBEKK, A., et al. "Transformation of Amyloid Precursor SAA to Protein AA and Incorporation in Amyloid Fibrils in Vivo." **Scandinavian Journal of Immunology**, vol. 21, no. 3, 1985, pp. 283–287.

JACOBSEN, S, THOMSEN, M.H, NANNI, S."Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses with joint disease." **Am. J. Vet. Rev.** v. 67. 2006. pp. 1738-1742.

JACOBSEN, S, et al. "Concentrations of Serum Amyloid A in Serum and Synovial Fluid from Healthy Horses and Horses with Joint Disease." **American Journal of Veterinary Research**, vol. 67, no. 10, 2006, pp. 1738–1742.

JACOBSEN, S, ANDERSEN, P.H. "The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses." **Equine Vet. Educ.** v.19n.1, 2007. pp. 38-46.

JACOBSEN, S, et al. "Serum Amyloid A Isoforms in Serum and Synovial Fluid in Horses with Lipopolysaccharide-Induced Arthritis." **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 110, no. 3-4, 2006, pp. 325–330.

JEAN-BAPTISTE, G, De CEULAER, K. "Osteoarticular disorders of hematological origin." **Baillieres Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.** v. 14, 2000 pp. 307-323.

JENSEN, L. E., & WHITEHEAD A.L. "Regulation of Serum Amyloid A Protein Expression during the Acute-Phase Response." **Biochemical Journal**, vol. 334, no. 3, 1998, pp. 489–503.

JUDY, C.E, GALUPPO, L.D. "Evaluation of iatrogenic hemarthrosis of the metacarpophalangeal joint as a method of induction of temporary reversible lameness in horses." **American Journal of Veterinary Research**. v.66, n. 6 2005 pp. 1084-1089.

KAWCAK, C. E., et al. "The Role of Subchondral Bone in Joint Disease: a Review." **Equine Veterinary Journal**, vol. 33, no. 2, 2010, pp. 120–126.

KAWAMURA, H. OGATA, K, MIURA, H. et al., "Spontaneous hemarthrosis of the knee in the elderly: etiology and treatment." **Arthroscopy** v. 10 1994 pp. 171-175.

KEG, P.R. et al., "Influence of the force applied and its period of application on the outcome of the flexion test of the distal forelimb of the horse" **Vet. Rec.** 1997, 141. pp. 463-466.

KEEGAN, K.G. "Evidence-based lameness detection and quantification." **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, 23, 2007. pp. 403-423.

KEEGAN, K.G. et al., "Evaluation of mild lameness in horses trotting on a treadmill by clinicians and interns or residents and correlation of their assessments with kinematic gait analysis." **American Journal of Veterinary Research**, 59, 1998. pp. 1370-1377.

KENT, J., "Acute Phase Proteins: Their Use in Veterinary Diagnosis." **British Veterinary Journal**, vol. 148, no. 4, 1992, pp. 279–282.

KIDD, J. A., et al. "Osteoarthritis in the Horse." **Equine Veterinary Education**, vol. 13, no. 3, 2010, pp. 160–168.

KRAMER, CM, et al. "Survey of the Therapeutic Approach and Efficacy of Pentosan Polysulfate for the Prevention and Treatment of Equine Osteoarthritis in Veterinary Practice in Australia." **Australian Veterinary Journal**, vol. 92, no. 12, 2014, pp. 482–487.

KUSHNER, I., et al. "Regulation of Biosynthesis and Secretion of Human C-Reactive Protein and Serum Amyloid A." **Acute Phase Proteins in the Acute Phase Response Argenteuil Symposia**, 1989, pp. 69–83.

KUSHNER, I. "The Phenomenon Of The Acute Phase Response." **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 389, no. 1 C-Reactive Pr, 1981, pp. 39–48.

KWAN, C, et al. "Effects of Intra-Articular Sodium Pentosan Polysulfate and Glucosamine on the Cytology, Total Protein Concentration and Viscosity of Synovial Fluid in Horses." **Australian Veterinary Journal**, vol. 90, no. 8, 2012, pp. 315–320.

LITTLE, C, GHOSH, P. "Potencial use of pentosan polysulfate for the treatment of equine joint disease" in.: McIlwraith C.W. Trotter, G eds. **Joint disease in the horse**. Philadelphia, PA, Saunders, 1993. pp. 281-292.

MAGALI, P. et al., "Variación del nivel de citoquinas en líquido synovial de equinos con enfermedad articular tratados con bisfosfonatos." **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**. v.7n.1.2013. pp.69-83.

MALLE, E, De BEER, F.C. "Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice." **European Journal of Clinical Investigation**. V.26.n.6. 1996. pp. 427-435.

MARANHÃO, R.P.A. et al., "Afecções mais frequentes do aparelho locomotor de equinos de tração no município de Belo Horizonte" **Arq. Bras. De Med. Vet.** v. 58,n.1. 2006. pp. 21-27.

MARHAUG, G. "Three Assays for the Characterization and Quantitation of Human Serum Amyloid A." **Scandinavian Journal of Immunology**, vol. 18, no. 4, 1983, pp. 329–338.

MARSHALL, JL, et al. "Phase 1 Trial Of Orally Administered Pentosan Polysulphate (Pps) In Patients With Advanced Malignancies." **Journal of Immunotherapy**, vol. 16, no. 3, 1994, p. 249.

MAY, S.A."Radiological aspects of degenerative joint disease." **Equine Veterinary Education**, v.8n.2, 1996, pp. 114-120.

MAHAFFEY, E.A. "Synovial fluid. In: COWEL, R.L.; TYLER, R.D. (eds)." **Cytology and hematology of the horse. American Veterinary**. 1992 PP. 153-161.

MCILWRAITH, C. W." General pathology of the joint and response to injury" in: Mcilwraith C.W.; Trotter G.W. eds: **Joints Disease in the horse**: Philadelphia, WB Saunders, 1996, p.40.

MCILWRAITH, C.W. "Frank Milne Lecture: From arthroscopy to gene therapy: 30 years of looking in joints." **Am. Assoc. Equine Pract.** v.51 2005 pp. 65-113.

MCILWRAITH, C.W.; TROTTER, G.W. (eds)." Joint disease in the horse." **Philadelphia: WB Saunders**, 1996, pp. 120-145.

MCILWRAITH, C. W. "Use of Synovial Fluid and Serum Biomarkers in Equine Bone and Joint Disease: a Review." **Equine Veterinary Journal**, vol. 37, no. 5, 2010, pp. 473–482.

MCILWRAITH, C. W., et al. "The Horse as a Model of Naturally Occurring Osteoarthritis." **Bone &Joint Research**, vol. 1, no. 11, 2012, pp. 297–309.

MCILWRAITH,C.W, FRISBIE, D.D, KAWCAK, C.E."Evaluation of intramuscularly administered sodium pentosan polysulfate for treatment of experimentally induced osteoarthritis in horse" **Am. J. Vet. Res.** v. 73. 2012 pp. 628-633.

MCLESKEY, S.W, et al. "Effects of AGM-1470 and Pentosan Polysulphate on Tumorigenicity and Metastasis of FGF-Transfected MCF-7 Cells." **British Journal of Cancer**, vol. 73, no. 9, 1996, pp. 1053–1062.

MERI, S., & PANGBURN. M.K., "Discrimination between Activators and Nonactivators of the Alternative Pathway of Complement: Regulation via a Sialic Acid/Polyanion Binding Site on Factor H." **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 87, no. 10, 1990, pp. 3982–3986.

MEDZHITOV, R. "Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame". **Cell Press** v. 140(6), 2010, pp. 771-776.

MOREIRA-TEIXEIRA, L. Et al., "Proinflammatory Environment Dictates the IL-17–Producing Capacity of Human Invariant NKT Cells". **The Journal of Immunology** v. 186, 2011, pp. 5758-5765.

MURATA, H, SHIMADA, N, YOSHIDA, M."Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview." **The Veterinary Journal** v.168(1), 2004, pp. 28-40.

NAGASE, H, et al. "Structure and Function of Matrix Metalloproteinases and TIMPs." **Cardiovascular Research**, vol. 69, no. 3, 2006, pp. 562–573.

NETHERY, A., et al. "The Chondroprotective Drugs, Arteparon and Sodium Pentosan Polysulphate, Increase Collagenase Activity and Inhibit Stromelysin Activity in Vitro." **Biochemical Pharmacology**, vol. 44, no. 8, 1992, pp. 1549–1553.

ODLIND, B., et al. "Preferential Localization of ³H-Pentosanpolysulphate to the Urinary Tract in Rats." **Pharmacology & Toxicology**, vol. 61, no. 3, 1987, pp. 162–166.

O'HARA, R., et al. "Local Expression of the Serum Amyloid A and Formyl Peptide Receptor-like 1 Genes in Synovial Tissue Is Associated with Matrix Metalloproteinase Production in Patients with Inflammatory Arthritis." **Arthritis & Rheumatism**, vol. 50, no. 6, 2004, pp. 1788–1799.

OLIVEIRA, C. M. B., et al. "Citocinas e Dor." **Revista Brasileira De Anestesiologia**, vol. 61, no. 2, 2011, pp. 260–265.

PARSONS, C. L., & MULHOLLAND.G.S., "Successful Therapy of Interstitial Cystitis with Pentosanpolysulfate." **Journal of Urology**, vol. 138, no. 3, 1987, pp. 513–516.

PEPYS, M. B., et al. "Serum Amyloid A Protein (SAA) in Horses: Objective Measurement of the Acute Phase Response." **Equine Veterinary Journal**, vol. 21, no. 2, 1989, pp. 106–109.

PLEASANT, R.S. et al., "Intra-articular anesthesia of the distal interphalangeal joint alleviates lameness associated with the navicular bursa in horses." **Veterinary Surgery**, 26, 1997, pp. 137-140.

POOLE, A.R. NIH White Paper: Biomarkers, The Osteoarthritis Initiative. A Basis For Discussion, **National Institute of Health**, Bethesda, Maryland, 2000, USA.

POOLE, A. R. "Can Serum Biomarker Assays Measure the Progression of Cartilage Degeneration in Osteoarthritis?" **Arthritis & Rheumatism**, vol. 46, no. 10, 2002, pp. 2549–2552.

PONCIA, H.D, RYAN, J. "An acutely painful elbow as a first presentation of von Willebrand's disease." **J. Accid. Emerg. Med.** v. 16, 1999 pp. 153-154.

POZZOBON, R. et al., "Clinical effect of parecoxib in induced synovitis in horses." **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootecnia**. V.60n.4. 2008. pp. 806-814.

RAEPPLE, E., et al. "Mode of Interaction of Different Polyanions with the First (C1) the Second (C2) and the Fourth (C4) Component of Complement—I." **Immunochemistry**, vol. 13, no. 3, 1976, pp. 251–255.

RIGGS, C. M. "Osteochondral Injury and Joint Disease in the Athletic Horse." **Equine Veterinary Education**, vol. 18, no. 2, 2010, pp. 100–112.

RIGGS, C. M., et al. "Pathology of the Distal Condyles of the Third Metacarpal and Third Metatarsal Bones of the Horse." **Equine Veterinary Journal**, vol. 31, no. 2, 1999, pp. 140–148.

ROBINSON, C. S, et al. "Are Serum Amyloid A or D-Lactate Useful to Diagnose Synovial Contamination or Sepsis in Horses?" **Veterinary Record**, vol. 181, no. 16, 2017, pp. 425–425.

ROGACHEFSKY, R, et al. "Treatment of Canine Osteoarthritis with Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) and Sodium Pentosan Polysulfate." **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 1, no. 2, 1993, pp. 105–114.

ROSS, M. W. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse: Pageburst Retail. Elsevier Saunders*, 2010.

ROSSDALE, P., et al. "Epidemiological Study of Wastage among Racehorses 1982 and 1983." **Veterinary Record**, vol. 116, no. 3, 1985, pp. 66–69.

ROSE, R.J.; HODGSON, D.R. "An overview of performance and sport medicine" In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. **The athletic horse**. Philadelphia; W.B Saunders, 1994. p. 5-11.

SAGE, A. M., & TURNER T.A., "Ultrasonography of the Soft Tissue Structures of the Equine Foot." **Equine Veterinary Education**, vol. 14, no. 4, 2010, pp. 221–224.

SAKTALVALA, J." Tumour necrosis factor- α stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage." **Nature**, 322, 1986.pp. 547-549.

SANCHEZ TERAN, A.F, et al., "Effects of repeated intra-articular administration of amikacin on serum amyloid A, total protein and nucleated cell count in synovial fluid from healthy horses." **Equine Vet. J.** v. 44n.43, 2012 pp. 12-16.

SCHLUETER, A. E. & ORTH. M.W., "Equine Osteoarthritis: a Brief Review of the Disease and Its Causes." **Equine and Comparative Exercise Physiology**, vol. 1, no. 4, 2004, pp. 221–231.

SCHUCHMAN, E.H., et al. "Pentosan Polysulfate: A Novel Therapy for the Mucopolysaccharidoses." **PLoS ONE**, vol. 8, no. 1, 2013

SHARATH, M. D., et al. "Small Heparin Fragments Regulate the Amplification Pathway of Complement." **Immunopharmacology**, vol. 9, no. 2, 1985, pp. 73–80.

SIMONARO, C. M., et al. "Involvement of the Toll-like Receptor 4 Pathway and Use of TNF- Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses." **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 107, no. 1, 2010, pp. 222–227.

SILVA, M.M. "Desenvolvimento de protocolo de avaliação, por determinação de escore, das alterações encontradas nas doenas articulares em equinos e sua correlação com evolução após tratamento." **Tese apresentada ao programa de pós graduação em clínica cirúrgica veterinária**. T.2987. 2014.pp.90.

STARKE, S. et al., "Vertical head and trunk movement adaptations to sound horses trotting in a circle on a hard surfasse." **Vet. J.** 2012. 193. pp. 73-80.

SURANJI WIJEKOON, H.M. et al., "Anti-arthritic effect of pentosan polysulfate in rats with collagen-induced arthritis." **Res. In Vet. Science** v. 122. 2019, pp. 179-185.

SNYDERMAN, R. "Mechanisms of inflammation and leukocyte chemotaxis in the rheumatic diseases." **Medical Clinics of North America**. v.70n.2. 1986. pp. 217-235.

SMITH, M. M., et al. "The Effects of Orally Administered Calcium Pentosan Polysulfate on Inflammation and Cartilage Degradation Produced in Rabbit Joints by Intraarticular Injection of a Hyaluronate—Polylysine Complex." **Arthritis & Rheumatism**, vol. 37, no. 1, 1994, pp. 125–136.

SOUZA, A.F, PARETSIS, N.F, ZOPPA, A.L.V. "What is the evidence of hyaluronic acid and polyacrylamide hydrogel in intra-articular therapy in equines? Systematic literature." **J. Equine Vet. Science** v. 86, 2020. pp. 1-5.

STANNUS, O., et al. "Circulating Levels of IL-6 and TNF- α Are Associated with Knee Radiographic Osteoarthritis and Knee Cartilage Loss in Older Adults." **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 18, no. 11, 2010, pp. 1441–1447.

STEEL, C. M. "Equine Synovial Fluid Analysis." **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, vol. 24, no. 2, 2008, pp. 437–454.

TAPE, C., et al. "Direct Evidence for Circulating ApoSAA as the Precursor of Tissue AA Amyloid Deposits." **Scandinavian Journal of Immunology**, vol. 28, no. 3, 1988, pp. 317–324.

Te MOLLER, N.C.R. " Does cartilage damage doom the joint?" **Dissertation Utrecht University Faculty of Med. Vet.** 2019.

TNIBAR, A. et al., "An international multi-centre prospective study on the efficacy of an intraarticular polyacrylamide hydrogel in horses with osteoarthritis: a 24 months follow-up" **Acta Vet. Scandinavica**, 57; 20. 2015. pp. 1-8.

TROEBERG, L., et al. "Calcium Pentosan Polysulfate Is a Multifaceted Exosite Inhibitor of Aggrecanases." **The FASEB Journal**, vol. 22, no. 10, 2008, pp. 3515–3524.

TROEBERG, L., et al. "Pentosan Polysulfate Increases Affinity between ADAMTS-5 and TIMP-3 through Formation of an Electrostatically Driven Trimolecular Complex." **Biochemical Journal**, vol. 443, no. 1, 2012, pp. 307–315.

TROTTER, W.G. et al., "Effects of intramuscular polysulfated glycosaminoglycan on chemical and physical defects in equine articular cartilage" **Canadian J. Vet. Res.** Vol. 53, 1989, pp. 224-230.

UHLAR, C.M, WHITEHEAD, A.S. "Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant." **Eur. J. Biochem.** v. 265. 1999. pp. 501-523.

VALDES, A.M., et al. "A Meta-Analysis of Interleukin-6 Promoter Polymorphisms on Risk of Hip and Knee Osteoarthritis." **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 18, no. 5, 2010, pp. 699–704.

VAN PELT, R.W. "Characteristics of normal equine tarsal synovial fluid." **Can. J. Comp. Med. Assoc.** v. 31, 1967, pp. 342-347.

VAN WEEREN, P.R. et al., "Early exercise advances the maturation of glycosaminoglycans and collagen in the extracellular matrix of articular cartilage in the horse" **Equine Veterinary Journal**. v. 40. 2008, pp. 128-135.

VOLP, A.C.P; ALFENAS, R.C.G; COSTA, N.M. et al., "Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica." **Arq. Bras. De End. E Metabolgia**. v.52, n.3 2008, pp. 537-549.

APENDICE A

Figura 11. Gráfico dos animais nos tempos e tratamentos com flexão

Figura 12. Gráfico da normalidade dos dados após os tratamentos com flexão.

Figura 13. Animais nos tempos e tratamentos sem flexão.

Figura 14. Normalidade dos dados após os tratamentos sem flexão

Figura 15. Média entre IL-6 x ASA x Claudicação.

Figura 16. Concentração média de IL-6 (pg/ml).

Figura 17. Concentração de ASA x IL-6 entre os tempos experimentais.

Figura 18. Avaliação citológico do líquido sinovial.