JULIANA JUNQUEIRA MOREIRA

Avaliação do queratam sulfato e ácido hialurônico presentes no líquido sinovial como biomarcadores das principais enfermidades articulares em equinos

> São Paulo 2018

JULIANA JUNQUEIRA MOREIRA

Avaliação do queratam sulfato e ácido hialurônico presentes no líquido sinovial como biomarcadores das principais enfermidades articulares em equinos

> Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo 2018 Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

г

T. 3641 FMVZ	Moreira, Juliana Junqueira Avaliação do queratam sulfato e ácido hialurônico presentes no líquido sinovial como biomarcadores das principais enfermidades de equinos / Juliana Junqueira Moreira. – 2018. 121 f. : il.
	Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2018.
	Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
	Área de concentração: Clínica Veterinária.
	Orientadora: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin. Coorientadora: Profa. Dra. Yara Maria Michelacci
	1. Equino. 2. Líquido sinovial. 3. Fratura. 4. Osteoartrite. 5. Osteocondrose. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Aparecida Laet, CRB-8/5673, da FMVZ.



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do queratam sulfato e ácido hialurônico presentes no líquido sinovial como biomarcadores das principais enfermidades articulares em equinos.", protocolada sob o CEUA nº 2562060214, sob a responsabilidade de Raquel Yvone Arantes Baccarin - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/11/2016.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 200 Equines (200 males), protocol number CEUA 2562060214, under the responsibility of **Raguel Yvone Arantes Baccarin** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/23/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2014 a 02/2018

Área: Clínica Médica Veterinária

Origem:	Não aplicável biotério						
Espécie:	Equídeos	sexo:	Machos	idade:	1 a 20 anos	N:	200
Linhagem:	Diversas			Peso:	250 a 600 kg	_	

Resumo: O presente trabalho objetiva detectar, quantificar e comparar as concentrações de COMP, queratam sulfato e ácido hialurônico no líquido sinovial de equinos atletas, sedentários, com artrite séptica, osteoartrite e osteocondrose. Serão utilizados 120 equinos entre sedentários, atletas, com osteoartrite, osteocondrose e artrite séptica que forem atendidos pelo Serviço de Clínica Médica de Equinos ou pelo Serviço de Cirurgia de Grandes Animais [] FMVZ/USP.

Local do experimento: universidade de sao paulo - faculdade de medicina veterinaria e zootecnia

São Paulo, 06 de abril de 2018

meliese Tcalar

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Moreira, Juliana Junqueira

Título: Avaliação do queratam sulfato e ácido hialurônico presentes no líquido sinovial como biomarcadores das principais enfermidades articulares em equinos

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

Data ____/___/____

Banca Examinadora

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

DEDICATÓRIA

À minha mãe Toninha, por me ajudar na minha evolução moral e espiritual nessa jornada Ao meu pai Antônio Carlos, pelo apoio extraordinário em todas as minhas aventuras Ao meu irmão Eduardo, pela cumplicidade de todas as horas

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de recomeçar, sempre

À minha orientadora Raquel Baccarin, o norte da minha bússola sem ponteiro

À Dra Yara, que aceitou a minha co-orientação e mais uma vez me pegou pela mão e me ensinou o beabá das moléculas. Que privilégio o meu!

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização (pessoal e profissional)

À equipe Baccarinzetes: Djoi, Fê, Tintia, Sarah, Ângela e Henrique (e agora Tintio e Erich), pelos incontáveis líquidos sinoviais guardados, pela paciência em me ouvir reclamar, pelo companheirismo desses anos. Aprendi muito com vocês

À Ciça, menina da voz doce que me amparou em todas as horas de laboratório da EPM

Ao Marcelo, que pacientemente me ensinou a trabalhar com o HPLC e não me matou (mesmo depois de eu ter entupido as colunas)

Aos professores do Departamento de Cirurgia, Luis Claudio, Andre Zoppa e Romero, pelos líquidos sinoviais coletados durante artroscopia

Ao Julio, por sempre me socorrer, além de guardar os líquidos sinoviais coletados

Aos residentes de 2015-2018, que contribuíram para a coleta de material deste projeto

Ao Cicero, pela ajuda de sempre, principalmente pra coletar cartilagem!

Às fadinhas do laboratório Claudia, Maria Helena, Clara, que me ajudaram nas duvidas e orientações, e à Dinha, que deixava a maquina de gelo sempre pronta para as eletroforeses

Às meninas da EPM, Elsa e Pat, por todo apoio psicológico e incentivos durante as minhas inúmeras tentativas de ensaios

EPÍGRAFE

Vi.V(enc)ER é um exercício de grandeza.

EvoluIR é uma vitória, onde somos nós mesmos nosso próprio adVERsário. CreScER é um espetáculo, e entre ensaios e improv(r)isos o show sempre continua.

RESUMO

MOREIRA, J. J. Avaliação do queratam sulfato e ácido hialurônico presentes no liquido sinovial como biomarcadores das principais enfermidades articulares em equinos. [Evaluation of keratan sulfate and hyaluronic acid in the synovial fluid as biomarkers of the equine joint disease]. 2018. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A alta demanda do sistema musculoesquelético dos equinos é importante fator de risco no surgimento da claudicação, uma vez que as articulações estão sujeitas as forças compressivas e de cisalhamento. Visto que a cartilagem é um tecido aneural, a dor só é desencadeada quando a enfermidade atinge a membrana sinovial ou o osso subcondral, tornando a gravidade das artropatias substancial antes da manifestação clínica. Assim, há a necessidade de diagnósticos preventivos e não apenas comprobatórios da extensão da lesão. Neste contexto, os biomarcadores do liquido sinovial (LS) auxiliam no reconhecimento precoce do processo de quebra de homeostasia articular. O desenvolvimento de diagnósticos moleculares específicos e biomarcadores preditivos como modelos para personalizar a medicina ortopédica equina têm ganhado ênfase; o objetivo é o desenvolvimento de diagnósticos não invasivos, com boa repetibilidade e fácil reprodução e com alta especificidade e sensibilidade, mesmo nos estágios mais iniciais das doenças articulares. O objetivo deste estudo foi caracterizar o comportamento dos principais biomarcadores do LS nas diferentes enfermidades articulares equinas. O LS de 166 articulações doentes foi coletado de 117 animais diagnosticados com fratura intra-articular, osteoartrite leve (OA1), moderada (OA2), severa (OA3) ou osteocondrose (OC). Como controle, foram coletadas 51 articulações metacarpofalangeanas e tibiotarsicas de 16 equinos hígidos sem doença articular. Imediatamente após a coleta foi realizada a contagem de células nucleadas, e o sobrenadante resultante da centrifugação do LS foi congelado a -80°C para quantificação da interleucina 1 (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina 10 (IL-10), prostaglandina E₂ (PGE₂), queratam sulfato (KS), ácido hialurônico (AH) e condroitim sulfato (CS), além da determinação do peso molecular do AH. Altas concentrações de IL-1 β ocorreram nos grupos OA1, OA2 e OC. As concentrações de TNF α foram maiores nos grupos Fraturas e OA. Tanto o grupo Fraturas quanto o grupo OA3 tiveram alta concentração de PGE2. O grupo controle teve concentração de KS superior aos grupos Fraturas, OA1 e OA3. A porcentagem de AH de alto peso molecular foi menor no grupo OA3.

Pode-se concluir que baixa concentração de KS e quebra da molécula de AH ocorrem em doenças com comprometimento cartilagíneo.

Palavras-chave: Equino. Liquido sinovial. Fratura. Osteoartrite. Osteocondrose.

ABSTRACT

MOREIRA, J. J. Evaluation of keratan sulfate and hyaluronic acid in the synovial fluid as biomarkers of the equine joint disease [Avaliação do queratam sulfato e ácido hialurônico presentes no liquido sinovial como biomarcadores das principais enfermidades articulares em equinos]. 2018. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The high demand of the musculoskeletal system of the horses is an important risk factor in the onset of claudication, since the joints are subject to compressive and shear forces. Since cartilage is an aneuronal tissue, pain is only triggered when the disease reaches the synovial membrane or the subchondral bone, making the severity of arthropathies substantial prior to clinical manifestation. Therefore, there is a need for preventive diagnoses and not just to confirm the extent of the lesion. In this context, the biomarkers of synovial fluid (SF) could help in the early recognition of the process of joint homeostasis breakdown. The development of specific molecular diagnoses and predictive biomarkers as models for customizing orthopedic equine medicine have gained emphasis. The aim this study is characterize the behavior of the main biomarkers of SF in the different equine joint disease. In this context, the objective of this study was to characterize the behavior of the main biomarkers of SF in the different equine joint diseases. The SF of 166 diseased joints was collected from 117 animals diagnosed with stress fracture (F), mild osteoarthritis (OA1), moderate (OA2), severe (OA3) or osteochondrosis (OC). As a control, 51 metacarpophalangeal and tibiotarsal joints were collected from 16 healthy horses without any joint disease. White blood cells count were performed immediately after collection, and the supernatant resulting from SF centrifugation were frozen at -80°C for later quantification of interleukin 1 (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNFα), interleukin 10 (IL-10), prostaglandin E₂ (PGE₂), keratam sulfate (KS), hyaluronic acid (HA) and chondrocyth sulfate (CS), as well as molecular weight determination of HA. Higher IL-1 β concentration occurs in the OA1, OA2 and OC groups. The Fractures and OA groups had higher TNFα concentration. Both the Fractures and OA3 groups had high PGE₂ concentration. The control group had higher KS concentration than the Fractures, OA1 and OA3 groups. The percent of high molecular weight AH (>2000 kDa) was lower in the OA3 group. We conclude that low KS concentration and breakdown of the AH molecule occur in the joint disease with loss of cartilage.

Key-words: Equine. Synovial fluid. Fracture. Osteoarthritis. Osteochondrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação gráfica do tipo Boxplot da distribuição das concentrações de IL-1 β
(A), TNFa (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) (pg/ml) presentes no LS coletado das
articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC - São Paulo -
201860
Figura 2- Eletroforese em gel de agarose 0,5% dos GAGs do LS coletado das articulações dos
grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC. CS: CS padrão, 5 µg; AH:
AH padrão, 5 μg – São Paulo – 201862
Figura 3 – Representação gráfica do tipo Boxplot da distribuição da concentração de CS (A) e
AH (B) no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2,
OA3 e OC – São Paulo – 201863
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% da padronização do peso molecular dos ácidos
hialurônicos utilizados como padrões em nossas analises. TB: AH de traqueia
bovina, 20 kDa, P100: padrão AH polidisperso, 100kDa; M100: padrão AH
monodisperso, 100kDa; M150: padrão AH monodisperso, 150 kDa; M200: padrão
AH monodisperso, 250 kDa; M601: padrão AH monodisperso, 601 kDa; M2500:
padrão AH monodisperso, 2500 kDa; CG1: AH de crista de galo, 1000 kDa
(1mg/ml); CG2: AH de crista de galo, 1000 kDa (2mg/ml) – São Paulo – 201864
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose peso molecular do AH do LS coletado das
articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC. CG:
padrão AH de crista de galo, 1000 kDa; TB: padrão AH de traqueia bovina, 20 kDa
– São Paulo – 2018
Even ζ Distribution de Aller de marte de Aller de marte de la ζ (A) 500 1000

Figura 6 – Distribuição da porcentagem de AH com peso molecular 0-500 kDa (A), 500-1000 kDa (B), 1000-2000 kDa (C) e >2000 kDa (D) no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.......65

LISTA DE GRÁFICOS

 coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018	Gráfico 1- Distribuição da contagem total de células nucleadas (células/µl) presentes no LS
 São Paulo – 2018	coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC -
 Gráfico 2– Distribuição da concentração de PGE₂ presente no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018	São Paulo – 2018
 grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 201861 Gráfico 3– Distribuição da concentração de KS presente no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018	Gráfico 2- Distribuição da concentração de PGE2 presente no LS coletado das articulações dos
 Gráfico 3– Distribuição da concentração de KS presente no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018	grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 201861
grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018	Gráfico 3- Distribuição da concentração de KS presente no LS coletado das articulações dos
Gráfico 4 – Porcentagem do peso molecular do AH presente no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 201865	grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 201862
dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 201865	Gráfico 4 - Porcentagem do peso molecular do AH presente no LS coletado das articulações
	dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 201865

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Raça, idade e sexo dos animais do grupo Fratura – São Paulo – 201845
Quadro 2 – Raça, idade e sexo dos animais do grupo OA1 – São Paulo – 2018
Quadro 3– Raça, idade e sexo dos animais do grupo OA2 – São Paulo – 201846
Quadro 4 – Raça, idade e sexo dos animais do grupo OA3 – São Paulo – 201847
Quadro 5 – Raça, idade e sexo dos animais do grupo OC – São Paulo – 201847
Quadro 6 – Raça, idade e sexo dos animais do grupo Controle – São Paulo – 201849
Quadro 7 – Parâmetros avaliados através do exame radiográfico e classificação proposta para
as alterações encontradas – 201849
Quadro 8 – Parâmetros da OA avaliados através do exame radiográfico e classificação das OAs
baseada nas alterações encontradas – 201856

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de p das comparações das medianas e intervalos interquartis entre os grupos
Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC. Os valores estatisticamente significativos
encontram-se em negrito – São Paulo – 2018
Cabela 2 – Valor de p e área abaixo da curva ROC (AUC) dos biomarcadores presente no LS
coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e
OC. Os valores estatisticamente significativos encontram-se em negrito – São Paulo
- 2018

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido hialurônico
AT	American Trotter
BH	Brasileiro de Hipismo
CS	Condroitim sulfato
CMRC	Carpometacárpica
GAGs	Glicosaminoglicanos
GlcN	Glucosamina
dl	Decilitro
EROs	Espécies reativas de ovigênio
EII	Espècies reativas de Oxigenio
ETD	fomorotibionatalar
	Gravidada
g IC	Internérmien
	Intercalpica
	Interlaingeana proximal
IL-IP	Interleucina I beta
kDa	Quilodaltons
kg	Quilograma
KS	Queratam sulfato
LS	Líquido sinovial
Μ	Molar
MEC	Matriz extracelular
MCF	metacarpofalangeana
ML	Mangalarga
mg	miligrama
ml	Mililitro
MMPs	Metaloproteinases
MTF	Metatarsofalangeana
ng	nanograma
NO	Óxido nitrico
ΝFκβ	Fator nuclear kappa beta
OC	Osteocondrose
OCD	Osteocondrite dissecante
PDA	1.3-diaminopropano-acetato
pg	picogramo
PGE ₂	Prostaglandina E_2
PSA	Puro Sangue Árabe
PSI	Puro Sangue Inglês
PSL	Puro Sangue Lusitano
OM	Quarto de Milha
RC	Radiocárpica
SB	Sela Belga
SBD	Sem Baca Definida
TNEa	Estor de necrose tumoral alfa
	Tampão Tris (hidrovimetil) aminomatano ásido alorídrico
TTT	Tibiotársion
11 11	Microlitro
μι	Microgramo
μg	wherogramo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 CARTILAGEM ARTICULAR	21
2.1.1 Condroitim Sulfato (CS)	23
2.1.2 Queratam Sulfato (KS)	
2.1.3 Ácido Hialurônico (AH)	27
2.2 LÍQUIDO SINOVIAL (LS)	
2.3 DOENÇAS ARTICULARES	
2.3.1 Osteocondrose (OC)	
2.3.2 Osteoartrite (OA)	
2.3.3 Fraturas intra-articulares	41
4 OBJETIVOS	43
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	43
5 MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1 ANIMAIS	
5.2 CLASSIFICAÇAO DAS OAS	
5.4 LÍQUIDO SINOVIAL	
5.4.1 Contagem celular	
5.4.2 Quantificação das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, e TNF- α e anti-inflamatórias	ria IL-10
	51
5.4.3 Quantificação da PGE ₂	51
5.4.4 Quantificação do KS	51
5.4.5 Quantificação do AH e CS	
5.4.6 Determinação do peso molecular AH	53
5.5 ANALISE ESTATÍSTICA	54

6 RESULTADOS	55
6.1 ANIMAIS	55
6.2 CLASSIFICAÇAO DAS OAS	56
6.3 LÍQUIDO SINOVIAL	57
6.3.1 Contagem celular	59
6.3.2 Quantificação das citocinas inflamatórias IL-1β, IL-6, e TNFα e anti-inflam	atória IL-10 59
6.3.3 Quantificação da PGE ₂	60
6.3.4 Quantificação do KS	61
6.3.5 Quantificação do AH e CS	62
6.3.6 Determinação do peso molecular de AH	64
6.3.7 Determinação da sensibilidade e especificidade dos biomarcadores do LS	66
7 DISCUSSÃO	68
8 CONCLUSÃO	76
9 REFERÊNCIAS	77
10 APÊNDICES	104

1 INTRODUÇÃO

O cavalo sempre foi utilizado pelo homem principalmente pela sua performance atlética, historicamente nas guerras, transporte e agricultura, e atualmente para o esporte e lazer (TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017). Tal exigência física aumenta a demanda do sistema musculoesquelético desses animais, particularmente as articulações, sujeitas a forças compressivas e de cisalhamento, podendo, consequentemente, gerar lesões limitantes da mobilidade e claudicações, uma das principais preocupações na indústria equina (DELAY, 2017; MCCARTY et al., 2015; NOVAKOFSKI et al., 2015; WYLIE et al., 2017).

Doenças articulares constituem a alteração clínica mais comum nos equinos (BERTUGLIA et al., 2016a; KIM et al., 2012; LACOURT et al., 2012; REED et al., 2012; UNITED STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE, 2000; WELSH et al., 2013). As lesões cartilagíneas podem se tornar substancialmente graves antes da manifestação dolorosa, uma vez que este tecido é aneural e a dor só é desencadeada quando atinge a membrana sinovial ou o osso subcondral, cujo periósteo é ricamente inervado (VAN WEEREN; BACK, 2016). Por esta razão, existe a necessidade do desenvolvimento de diagnósticos que permitam monitorar a saúde e o treinamento de animais atletas, agindo de maneira preventiva e não apenas comprobatória da extensão da lesão (MCCILWRAITH; CLEGG, 2014).

Os componentes articulares podem ser isolados para estudos *in vitro*, fornecendo informações importantes sobre os eventos moleculares teciduais (CUNHA et al., 2017; SKIÖLDEBRAND et al., 2017; SVALA et al., 2015), mas não refletem a complexidade das situações *in vivo*, uma vez que as interações ambientais, a ampla gama de estresse por cargas biomecânicas e as diferenças individuais desempenham importante papel na morbidade das artropatias (MAEDA; HANADA; OIKAWA, 2016). A avaliação clínica articular pode ser feita por meio de exame físico e de imagem, mas reflete apenas as consequências estruturais ou funcionais dos distúrbios homeostáticos (TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017). Consequentemente, muitos subtipos de doenças com causas moleculares distintas ainda são classificados como entidade única, havendo pouca capacidade de estratificação ou vinculo de fenótipos distintos (DESMOND-HELLMANN et al., 2011). O entendimento da biologia intrínseca de cada processo levaria a um avanço na compreensão da patogenia das doenças e, consequentemente, à tratamentos mais eficazes (KRAUS et al., 2015; LOESER, 2013). Neste contexto, os biomarcadores tornam-se fundamentais (TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017).

Biomarcadores são características que podem ser mensuradas objetivamente e avaliadas como indicadores de processos biológicos normais, patogênicos ou em resposta a fármacos e

intervenções terapêuticas. Eles podem ser, ainda, parâmetros anatômicos, fisiológicos, bioquímicos ou moleculares, associados a presença e severidade de enfermidades especificas, podendo ser detectados por diversos métodos, incluindo exame físico, ensaios laboratoriais e técnicas de imagem (THE BIOMARKER DEFINITIONS WORKING GROUP, 2001).

O líquido sinovial (LS) é continuamente renovado e está em contato direto com quase todos os componentes teciduais articulares relevantes, a exceção do osso subcondral, e sua composição fornece informações em tempo real do ambiente articular (PEFFERS et al., 2015). Ainda, é o único componente que pode ser obtido com relativa facilidade do animal vivo sem provocar destruição tecidual significativa. Sendo assim, biomarcadores moleculares do LS têm sido estudados intensamente nas doenças articulares (HSUEH; ÖNNERFJORD; KRAUS, 2014; LOTZ et al., 2014), nas quais o reconhecimento precoce do processo de quebra de homeostasia tem alto valor diagnostico e prognostico (CHU; ANDRIACCHI, 2015)

O desenvolvimento de diagnósticos moleculares específicos e biomarcadores preditivos como modelos para personalizar a medicina ortopédica equina têm sido promovidos (MOBASHERI; HENROTIN, 2015). O objetivo comum é o desenvolvimento de diagnósticos não invasivos, com boa repetibilidade e fácil reprodução e com alta especificidade e sensibilidade, mesmo nos estágios mais iniciais das doenças articulares (MCILWRAITH et al., 2017).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A articulação diartrodial é um órgão complexo composto pela membrana sinovial revestindo a camada interna da capsula articular fibrosa, osso subcondral, cartilagem articular e, em algumas articulações, estruturas intra-articulares como ligamentos e meniscos. Tais elementos interagem intimamente direta e/ou indiretamente por meio do LS que ocupa o espaço articular (HUI et al., 2012; POURAN et al., 2017). O metabolismo tecidual articular é modulado por cargas mecânicas que ativam as vias de transdução de sinais, os quais traduzem o estimulo mecânico em sinais bioquímicos que orquestram as funções celulares e o remodelamento da matriz extracelular (MEC) (HITCHENS et al., 2017; KHAN; SCOTT, 2009; MA et al., 2018).

A membrana sinovial é uma fina camada de tecido conjuntivo altamente vascularizada, composta pelas camadas intima e subintima. A camada intima é constituída por macrófagos (células tipo A) e fibroblastos (células tipo B) dentro da MEC, enquanto a camada subintima inclui vasos sanguíneos e linfáticos e fibras nervosas (SMITH, 2011; WECHALEKAR; SMITH, 2014). A homeostase articular é controlada pela membrana sinovial, que atua como barreira mecânica no transporte de moléculas entre o plasma e o LS, controlando seu volume e composição e, consequentemente, garantindo a lubrificação cartilagínea e a nutrição dos condrócitos (SMITH, 2011; TIWARI et al., 2010). Nas artropatias, as alterações celulares, bioquímicas e estruturais da membrana sinovial resultam em alterações na composição e propriedades do LS (HUI et al., 2012; SMITH, 2011).

O osso subcondral é adjacente e integrado a cartilagem articular, e tem como funções manter a forma articular e absorver estresse mecânico (KAWCAK et al., 2001; ULRICH et al., 2018). Contribui potencialmente na patogênese de algumas artropatias, uma vez que alterações em sua estrutura e composição estão associadas a lesões cartilagíneas (LACOURT et al., 2012; MURATOVIC et al., 2018; RAMME et al., 2016).

2.1 CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular é a cartilagem hialina que reveste as superfícies articulares e protege as extremidades ósseas contra atritos e lesões por meio da absorção, distribuição e transmissão das forças compressivas incidentes sobre ela (LAWLESS et al., 2017; MALEKIPOUR et al., 2013; MANSFIELD; BELL; WINLOVE, 2015; ROUGHLEY; MORT, 2014). Fatores como superfície óssea, conformação anatômica e exercício influenciam a espessura e composição da cartilagem articular (APPLETON, 2017; MARTEL et al., 2016a;

NOVAKOFSKI et al., 2015; PINILLA et al., 2017; REED et al., 2013; SPRACKMAN et al., 2015; TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017). Uma vez que sua capacidade regenerativa é extremamente limitada em organismos adultos (HEINEMEIER et al., 2016; KEENEY; LAI; YANG, 2011), o balanço apropriado entre as atividades anabólicas e catabólicas é fundamental para a manutenção de sua integridade e para o reparo dos danos moleculares que ocorrem naturalmente (MUELLER; TUAN, 2011).

A cartilagem articular é um tecido aneural e avascular, constituída por condrócitos alojados em uma MEC. Em média, 1-10% do peso úmido da cartilagem corresponde aos condrócitos, responsáveis pela síntese e degradação da MEC (ZHANG; EGAN; WANG, 2015). Esta, por sua vez, é composta por uma matriz orgânica e fluido intersticial. A matriz orgânica corresponde a 20-30% do peso úmido da cartilagem e é composta principalmente por colágeno, proteoglicanos e proteínas. O fluido intersticial é constituído por 60-80% de água (BHOSALE; RICHARDSON, 2008; HEINEGARD; SAXNE, 2011; PEFFERS et al., 2014). O equilíbrio entre síntese e degradação das macromoléculas constituintes da MEC é rigorosamente regulado por metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) (HUI et al., 2012; TCHETVERIKOV et al., 2005), e mantido por meio da atividade física controlada (REED et al., 2013; TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017).

O colágeno é a macromolécula mais abundante na cartilagem articular, distribuído de maneira estratificada, com maior concentração nas camadas superficiais (NIEMINEN et al., 2015). É sintetizado pelos condrócitos e tem como principal função conferir resistência à cartilagem (CUNHA et al., 2017; DREIER, 2010). O colágeno tipo II é o principal componente da fibra colágena adulta, disperso na matriz sob a forma de fibrilas, colaborando para a integridade estrutural da cartilagem (BHOSALE; RICHARDSON, 2008; NICKIEN; THAMBYAH; BROOM, 2017; POURAN et al., 2018).

Os proteoglicanos são moléculas formadas pela interação não covalente e estabilizada por proteínas de ligação entre um filamento central de ácido hialurônico (AH) com o core proteico de múltiplas moléculas de agrecam (HEINEGARD, 2009; ROUGHLEY; MORT, 2014). O core proteico do agrecam é constituído por três regiões globulares (G1, G2 e G3) ligadas por pontes dissulfeto e separadas por uma extensa região (SANDY et al., 1990). A região G1 é formada pelos domínios A, B e B', sendo o domínio A responsável pela interação com as proteínas de ligação e o domínio B pela interação com AH (MATSUMOTO et al., 2003; WATANABE et al., 1997). A região G2 é composta por dois domínios tipo B, mas sem habilidade de interação com AH. Entre G1 e G2 está o domínio interglobular, frequentemente alvo de proteinases (FOSANG et al., 1992). As regiões G2 e G3 estão separadas por uma longa

cadeia de glicosaminoglicanos (GAGs) composta por um domínio rico em queratam sulfato (KS), adjacente a G2, seguido pelo domínio rico em condroitim sulfato (CS) (BARRY et al., 1994). Normalmente a molécula de agrecam possui muitas cadeias de CS e poucas de KS (DOEGE et al., 1991; KIANI et al., 2002), sendo o número de repetições de cada cadeia variável de acordo com a espécie. A porção carboxiterminal do core proteico fica na região G3, composta por dois domínios tipo fator de crescimento epidérmico (EGF), um domínio tipo lectina tipo C e um domínio tipo proteina reguladora do crescimento (CRP). Esta região é essencial para a movimentação do agrecam dentro dos condrócitos e para sua secreção dentro da MEC (ZHENG; LUO; TANZER, 1998).

O agrecam é considerado o maior e o principal proteoglicano da cartilagem articular, composto principalmente por GAGs (HUDETZ et al., 2017; ROUGHLEY; MORT, 2014), que são polissacarídeos lineares, não ramificados, constituídos por repetidas unidades dissacarídicas, formadas por um açúcar aminado (N-acetil-glicosamina ou N-acetil-galactosamina) e ácido urônico (ácido glicurônico ou idurônico) (SASARMAN et al., 2016). Os GAGs são classificados de acordo com a composição monomérica, tipo de ligações glicosídicas, grau e posição da sulfatação (ESKO et al., 2009; OSAGO et al., 2014; ZAIA, 2009). A maioria dos proteoglicanos são compostos por CS, dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS), KS e AH (SASARMAN et al., 2016; TAYLOR; GALLO, 2006). A natureza sulfatada destes componentes confere ao agrecam caráter altamente aniônico, permitindo a incorporação de água à matriz, expandindo seu volume e facilitando seu preenchimento pelas fibras colágenas, fato que confere resistência à cartilagem para suportar cargas compressivas (CATERSON; MELROSE, 2018; NICKIEN; THAMBYAH; BROOM, 2017; POURAN et al., 2018; ROUGHLEY; MORT, 2014; TROEBERG; NAGASE, 2012).

2.1.1 Condroitim Sulfato (CS)

O CS é o GAG presente em maior quantidade na cartilagem articular, na concentração aproximada de 75,7 nmol/mg de cartilagem (OSAGO et al., 2014). É um polissacarídeo complexo composto por repetidas unidades dissacaridicas de (1-4)- β -d-glucoronosil-(1-3)- β -N-acetilgalactosamina (LAUDER, 2009; SASARMAN et al., 2016), modificado por grupos sulfato que substituem um ou mais grupos hidroxila em C4 e/ou C6 da galactosamina e/ou C2 do ácido urônico. A sulfatação da N-acetilgalactosamina na posição C4 ou C6 origina o condroitim 4 sulfato (CS4) ou condroitim 6 sulfato (CS6) (SÄÄMÄNEN et al., 1989), ambos componentes do agrecam, contribuindo para a eletronegatividade deste proteoglicano e

consequente retenção de liquido tecidual (GUPTA et al., 2012; MIKAMI; KITAGAWA; 2013). Em humanos e equinos, o grau de sulfatação é alto durante a vida fetal e a formação de CS4 e CS6 ocorre equilibradamente. Após o nascimento, o padrão de sulfatação muda gradualmente, predominando o CS6 (BROWN et al., 1998; MICHELACCI; GLASHAN; SCHOR, 1989). Além da idade, a proporção de CS4 e CS6 pode ser alterada pelo exercício e por algumas artropatias (BAYLISS et al., 1999; BROWN et al., 1998, 2007; MICHELACCI; LAREDO; DIETRICH, 1981; NAKAJIMA et al., 2013).

A função do CS está diretamente relacionada com o tamanho e os padrões de sulfatação da molécula, que diferem entre os tecidos (IMADA et al., 2010; MICHELACCI; DIETRICH, 1976; OSAGO et al., 2014; SASARMAN et al., 2016). De maneira geral, o CS está envolvido na regulação estrutural e na manutenção da MEC da cartilagem (LEGENDRE et al., 2008; WATANABE et al., 2010), participa da proliferação celular através de interações com fatores de crescimento (MIKAMI; KITAGAWA, 2013; SUGAHARA et al., 2003) e controle da apoptose dos condrócitos (CAMPO et al., 2009a; JOMPHE et al., 2008). Ainda, regula a síntese de colágeno e participa da fisiologia e funções biomecânicas de tendões e ligamentos (HALPER, 2014). O efeito anti-inflamatório do CS foi demonstrado em diferentes modelos de estudos *in vitro* e *in vivo* (HENROTIN et al., 2010; HOCHBERG et al., 2013).

O uso do CS, muitas vezes em conjunto com a glucosamina (GlcN), no tratamento da osteoartrite (OA) é relatado (MORITA et al., 2017; STABLER et al., 2016), dada sua capacidade em minimizar os sintomas da doença e modificar a estrutura cartilagínea (BRUYERE et al., 2016; HENROTIN et al., 2010; HOCHBERG et al., 2013; MA et al., 2018; SANCHES et al., 2017). Estudos de meta-análise revelaram redução significativa do estreitamento do espaço articular pelo CS (HOCHBERG, 2010) e sua capacidade em minimizar a perda cartilagínea (MARTEL-PELLETIER et al., 2015; WILDI et al., 2011), sugerindo seu potencial como agente modificador de doença. Recentemente, a combinação de CS e GlcN foi capaz de diminuir a inflamação, avaliada por meio da presença de edema e efusão articular (FRANSEN et al., 2015; HOCHBERG et al., 2016).

Existem evidencias convincentes de que o CS e a GlcN podem preservar ou até mesmo reparar as lesões cartilagíneas na OA (BACCARIN et al., 2012; HOCHBERG et al., 2013; MA et al., 2018) através da modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias (SANCHES et al., 2017). Pacientes humanos com OA tratados com CS apresentaram aumento da viscosidade e da concentração de AH do LS concomitante a menor atividade colagenolítica (HENROTIN; LAMBERT; RICHETTE, 2014). O CS também demonstrou ser capaz de controlar a infiltração

e ação celular, a liberação de mediadores bioquímicos e a angiogênese durante a sinovite (TIO et al., 2017).

A modulação da expressão e da ação de citocinas e mediadores inflamatórios pelo CS em doenças articulares têm sido demonstradas *in vitro* (CAMPO et al., 2009a; ORLOWSKY et al., 2014). O mecanismo primário de ação do CS consiste na inibição da atividade do fator nuclear kappa beta (NF $\kappa\beta$) (DU SOUICH, 2014; STABLER et al., 2017; VALLIERES; DU SOUICH, 2010), mas seu efeito anti-inflamatório é dependente do inflassoma (STABLER et al., 2016). Particularmente o CS4 apresenta potencial antioxidante (CAMPO et al., 2008). Calamia et al. (2012) investigaram os efeitos do CS sobre os condrócitos humanos estimulados com interleucina 1 beta (IL-1 β), e observaram sua capacidade de modular a expressão de diversas moléculas do sistema complemento, além de reduzir a ativação de MMPs e superexpressar proteínas imunomodulatórias. Recentemente, a atividade anti-inflamatória do CS em culturas de condrócitos e macrófagos cartilagíneos foi demonstrada por Cunha et al. (2017), que observaram redução na liberação de oxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE₂) e fator de necrose tumoral (TNF α) induzida pela IL-1 β .

Aumento de CS no LS pode estar vinculado a processos anabólicos da cartilagem articular (MCILWRAITH; FRISBIE; KAWCAK, 2012a), mas também foi proposto por Baccarin et al. (2014) como biomarcador para doenças com destruição cartilagínea.

2.1.2 Queratam Sulfato (KS)

O KS foi identificado primeiramente na córnea por Suzuki et al. (1939) e nomeado de querato sulfato após sua caracterização (MEYER et al., 1953). É um GAG não ramificado amplamente distribuído na MEC dos tecidos epitelial, nervoso e conjuntivos sujeitos a tensão e suporte de carga, como ossos e cartilagem (FUNDERBURGH, 2000, 2002; POMIN, 2015). Composto por repetidas unidades dissacarídicas de β -galactose ligadas ao N-acetil-D-glicosamina-6-sulfato (COOPER et al., 2002; FUNDERBURGH, 2000, 2002), é o único GAG que não suporta um resíduo ácido (FUNDERBURGH, 2000, 2002; POMIN et al., 2012), não precisando da oxidação para seus constituintes dissacarídicos, fato que permite o crescimento de suas cadeias durante a vida, mesmo considerando a natureza avascular da cartilagem articular (BALDUINI et al., 1992).

O KS apresenta três grupos de ligação ao core proteico do agrecam, sendo o grupo N ligado a asparagina e o grupo O ligado a resíduos de serina ou treonina. Estes grupos de ligação são tecido-específicos (CATERSON; MELROSE, 2018; SASARMAN et al., 2016). O queratam corneal é do tipo I e está ligado ao core proteico pelo grupo N ligado a asparagina; o queratam cartilagíneo é tipo II e tem o grupo O ligado a resíduos de serina ou treonina através de estruturas do tipo mucina no core proteico; o queratam tipo III é identificado no tecido nervoso e apresenta um resíduo de manose ligado ao grupo O via resíduo de serina no core proteico (FUNDERBURGH, 2002).

Assim como todos os GAGs, a função do KS é determinada pelo padrão de sulfatação. De maneira geral este GAG regula as propriedades celulares nos tecidos ósseo (OSAWA et al., 2006), epitelial (CATERSON; MELROSE, 2018) e mesenquimal (HADLEY et al., 2016), contribuindo para a composição e organização da MEC (CHEN; BIRK, 2013; CHEN et al., 2014; DELLETT et al., 2012). Na córnea, mantem a hidratação (FUNDERBURGH, 2000), enquanto nos ossos participa da estrutura de proteoglicanos com propriedades de ligação celular (SOMMARIN et al., 1998). No tecido nervoso, desempenha importante papel na sinalização celular, na orientação axonal e na angiogênese (BURG; COLE, 1994; CONRAD et al., 2010; DELLETT et al., 2012; OLSSON et al., 1996).

Em humanos, alterações no KS estão vinculadas a diversas doenças oculares (GARCIA et al., 2016; PATEL et al., 2011), neurológicas (FOYEZ et al., 2015; ZHANG et al., 2017) e neoplásicas (NAKAYAMA et al., 2013). Alguns estudos têm demonstrado a capacidade do KS em inibir a expressão e ativação de MMPs em tecidos cutâneo e corneal (ISNARD; ROBERT; RENARD 2003) e reduzir o influxo de neutrófilos e das concentrações de citocinas inflamatórias e MMPs pulmonares (GAO et al., 2017), sugerindo seu potencial terapêutico nas inflamações (POMIN, 2015). Curiosamente, Matsui et al. (2013) observaram a menor expressão de KS na neurite induzida em camundongos, ao mesmo tempo em que a expressão de citocinas pro-inflamatórias aumentou, sugerindo o uso deste GAG como biomarcador para a enfermidade.

O KS tipo II é encontrado na concentração aproximada de 5 nmol/ mg de cartilagem (OSAGO et al., 2014), sendo constituído por dissacarídeos dissulfatados interrompidos ocasionalmente por resíduos monossulfatados de N-acetillactosamina. Os motivos de sulfatação do KS transmitem informações importantes de reconhecimento molecular e comportamento celular através de proteínas interativas (CATERSON; MELROSE, 2018).

O papel do KS na supressão das lesões cartilagíneas tem sido reportado por alguns estudos (CAMPO et al., 2009a; HAYASHI; KADOMATSU; ISHIGURO, 2010; HAYASHI et al., 2011). Embora Campo et al. (2009a) não tenham observado nenhum efeito modulador do KS sobre condrócitos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS), Hayashi, Kadomatsu e Ishiguro (2010) comprovaram que explantes de cartilagem desafiados com IL-1β apresentaram menor perda de agrecam quando tratados com KS. Ainda, camundongos geneticamente modificados para a sulfatação do KS apresentaram maiores lesões cartilagíneas quando comparados com camundongos normais, demonstrando o papel crucial da sulfatação 6 do grupo N-acetil-D-glicosamina em retardar a progressão de danos a cartilagem articular, bem como o potencial terapêutico do KS exógeno, uma vez que a injeção intraperitoneal foi capaz de suprimir as lesões *in vivo* (HAYASHI et al., 2011). Em equinos, foi descrita a avaliação do *turnover* e/ou degradação da cartilagem articular pela mensuração do KS sérico por ELISA (LETTRY et al., 2010).

Em 1998, Okumura e Fujinaga descreveram um anticorpo monoclonal para a detecção do KS no LS de cavalos, conseguindo detectar concentrações entre 10 e 160 ng/ml (OKUMURA; FUJINAGA, 1998). Aparentemente, as concentrações deste GAG no LS tendem a ser menores nos animais doentes, independentemente da variação sérica (OKUMURA; FUJINAGA, 1998; TODHUNTER et al., 1997). A idade também parece exercer efeito significativo sobre a concentração de KS sérico (MISUMI et al., 2002) e no LS, sendo as maiores concentrações plasmáticas encontradas em potros (TODHUNTER et al., 1997). O KS é o GAG com o maior número de anticorpos desenvolvidos para seus diversos epítopos em uma clara tentativa dos pesquisadores em desvendar seu papel na patogênese das mais variadas enfermidades (CATERSON; MELROSE, 2018).

2.1.3 Ácido Hialurônico (AH)

As primeiras pesquisas envolvendo o AH começaram nos últimos anos do século XIX com Portes, na França (1880) e Mörner de Uppsala, na Suécia (1884). Em 1934 Karl Meyer e John Palmer analisaram um novo composto contendo duas moléculas de açúcar, das quais uma era o ácido urônico, a partir do humor vítreo de olhos de bovinos, nomeando oficialmente ácido hialurônico (MEYER; PALMER, 1934). Esta molécula é um GAG não sulfatado de alto peso molecular composto por repetidas unidades dissacarídicas de β 1-3 d-N-acetilGlcN e β 1-4 ácido d-glucorônico (SASARMAN et al., 2016).

O AH é o componente de maior tamanho (2000 a 8000 kDa) da MEC dos tecidos articulares (COWMAN et al., 2015), e cada miligrama de cartilagem contem aproximadamente 0,6 nmol de AH (OSAGO et al., 2014). É sintetizado por enzimas no citoplasma de condrócitos e sinoviócitos, e liberado para o meio extracelular à medida que ocorre a extensão de sua cadeia por adição de monossacarídeos (HUBBARD et al., 2012). Sua meia vida no LS é de aproximadamente de 120 minutos (LI et al., 2012). Sua estrutura molecular possui uma parte

hidrofílica e outra hidrofóbica, conferindo a sua molécula o formato de espiral que, em meio aquoso, se expande (COWMAN; MATSUOKA, 2005). Tal fato o torna responsável pelas propriedades viscoelásticas do LS (COWMAN et al., 2015), cuja função é lubrificar a cartilagem e amortecer as forças compressivas articulares (AVENOSO et al., 2018).

As diversas atividades biológicas do AH estão associadas ao seu peso molecular e a sua concentração (CAMPO et al., 2010a; MARCELLIN; STEEN; NIELSEN, 2014; SANCHEZ LAZARO et al., 2010). Em condições patológicas, a molécula de AH é quebrada em pequenos oligossacarídeos (AVENOSO et al., 2018; BASTOW et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2004), diminuindo a viscosidade do LS e ativando a cascata da inflamação (VALACHOVA et al., 2016). Apesar de haverem teorias associando a quebra da molécula de AH com a ação direta das espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas inflamatórias e MMPs (CAMPO et al., 2013; JIANG; LIANG; NOBLE, 2011; ESSER et al., 2012), Neuenschwander (2016) demonstrou que as EROs não estão envolvidas na quebra da molécula de AH durante a sinovite.

Estudos *in vitro* demonstraram que pequenos fragmentos de AH (<500 kDa) são capazes de induzir repostas inflamatórias (YOSHIOKA et al., 2013), incluindo ativação de macrófagos e maturação de células dendríticas (TERMEER et al., 2000). Outras investigações reportam que o AH de baixo peso molecular estimula as células do sistema imune (CAMPO et al., 2009b, 2010b; 2010c) e a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos (CAMPO et al., 2010b, 2012, 2013) através da ativação da cascata do NF $\kappa\beta$ (CAMPO et al., 2009b). A indução da apoptose dos condrócitos também parece ser modulada por pequenos fragmentos de AH (CAMPO et al., 2015)

Galois et al. (2012) e Neuenschwander (2016) afirmaram que, independentemente do tamanho da molécula, o AH é capaz de exercer efeito condroprotetor sobre sinovite induzida experimentalmente. Muramatsu et al. (2014), no entanto, relataram que o GAG apenas promove a melhora da locomoção, não sendo capaz de prevenir as alterações histológicas associadas a OA. Segundo Duan et al. (2017), o tratamento intra-articular com AH, associado ou não ao plasma rico em plaquetas, não impediu o aparecimento de lesões da cartilagem articular e membrana sinovial em articulações com OA induzida, apenas atenuaram a severidade das mesmas.

Em geral, moléculas de alto peso (>1000 kDa) promovem a integridade celular e o suporte tecidual (EL-HAKIM; ELYAMANI, 2011; TSAI et al., 2013) e demonstram ter efeitos anti-inflamatórios e imunossupressivos (CAMPO et al., 2011; RUPPERT et al., 2014; STABLER et al., 2017). O uso de AH exógeno no tratamento clinico da inflamação articular tem sido relatado (AULIN et al., 2017; AVENOSO et al., 2018; LITWINIUK et al., 2016) e

apontado como promotor da melhora clínica, uma vez que a viscosuplementação reestabelece a homeostase pela indução da produção de AH endógeno (SMITH et al., 2008), inibição das vias inflamatórias e da produção de radicais livres (YOSHIOKA et al., 2014), além de modular a degradação do agrecam (NEUENSCHWANDER, 2016; ZHANG et al., 2016) e estimular o anabolismo ósseo (TUNCAY et al., 2013) e cartilagíneo (BAUER et al., 2017; LU et al., 2013; MIGLIORE; PROCOPIO, 2015;). Ainda, é descrito seu potencial condroprotetor pela preservação do número de condrócitos em articulações imobilizadas (ANDO et al., 2008) e inflamadas (DUYGU et al., 2011).

Jansen et al. (2008) constataram que o tratamento intra-articular com AH é capaz de modular a morte dos condrócitos após lesão cartilagínea. Ato continuo, Smith et al. (2008) induziram cirurgicamente a OA em ovelhas e observaram que a aplicação de AH ou de seu derivado diminuiu a sinovite e a fibrose articular, e restabeleceu as concentrações da molécula de alto peso no LS. Além de controlar a degeneração cartilagínea e fibrose periarticular induzidas pela OA, Plaas et al. (2011) comprovaram a melhora clínica do padrão de locomoção com apenas uma aplicação de AH. Corroborando com tais estudos, os resultados encontrados por Li et al. (2012) revelam que o uso do AH como tratamento da OA induzida experimentalmente não só controla a sinovite e a fibrose periarticular, como também aumenta a expressão de fatores condrogenicos e inibe a expressão de fatores degradantes e fibrogenicos da cartilagem, osso subcondral e tecidos periarticulares.

Segundo Hashizume e Mihara (2009), o uso do AH de alto peso molecular concomitante ao tratamento intra-articular com anti-inflamatório é capaz de diminuir a produção de MMPs induzidas pelo fármaco. A associação de anestésicos e corticoides com o AH também demonstrou ser efetiva na proteção da cartilagem frente as lesões da OA (IANNITTI et al., 2013; ZHANG et al., 2016). Ainda, é descrito o potencial do AH na proteção e reparo de lesões osteocondrais (HIRAOKA et al., 2011) e na promoção da analgesia articular (HASHIZUME et al., 2010; LU et al., 2013; YOSHIOKA et al., 2014).

Em 1958, Mohring publicou o primeiro trabalho investigativo do peso molecular do AH. A estimativa do peso molecular do AH depende da fonte do composto, do método de isolamento da molécula e do método utilizado para a mensuração. Em 1994, Lee e Cowman reportaram o uso da eletroforese em gel de agarose 0,5% para analisar a distribuição da massa molecular do AH. Neste método, os autores estabeleceram a relação linear entre a distância de migração e o logaritmo da massa molecular. Esta metodologia foi baseada nas técnicas de separação de DNA, uma vez que a molécula do AH tem relação carga:massa constante e, portanto, sua filtração dentro do gel ocorre somente com base no tamanho de suas moléculas (COWMAN et al., 2011). Posteriormente, Cowman et al. (2011) otimizaram a metodologia, encontrando moléculas com massa entre 200 kDa e 2000 kDa para amostras polidispersas. Segundo Bhilocha et al. (2011), o gel de agarose na concentração de 0,5% é mais indicado para análise de moléculas com peso superior a 200 kDa, enquanto a concentração de 1-2% é mais adequada para massas entre 80 kDa a 1500 kDa. Moléculas com peso inferior a 100 kDa são melhor avaliadas em gel de poliacrilamida entre 4-20%.

2.2 LÍQUIDO SINOVIAL (LS)

O LS é um ultrafiltrado do plasma no qual vários componentes são adicionados pelas células e tecidos articulares. Além de sua função como importante comunicador entre os vários tecidos, o LS também lubrifica e auxilia a redistribuição de forças durante o movimento, e cumpre importante papel na nutrição e remoção de resíduos da cartilagem articular (AVENOSO et al., 2018; HUI et al., 2012).

Normalmente, o LS é claro, viscoso, e composto principalmente por pequenas proteínas derivadas do plasma, como albumina e transferrina, uma vez que a membrana sinovial atua como barreira seletiva, impedindo a difusão de grandes proteínas (HUI et al., 2012). Em cavalos, a concentração normal de proteínas no LS é 1 g/dl (VENDRUSCOLO, 2017), mas em processos inflamatórios articulares há aumento significativo tanto na concentração (NEUENSCHWANDER, 2016) quanto no tamanho das proteínas, indicando mudanças funcionais e estruturais da membrana sinovial (HUI et al., 2012; SMITH, 2011). A contagem celular do LS hígido é baixa, 200 células/µl em média (MORAES et al., 2015; MOREIRA et al., 2015; VENDRUSCOLO, 2017), sendo este número determinado pela presença de linfócitos e macrófagos, além de células de revestimento. A presença de hemácias é incomum e está relacionada ao trauma.

A viscosidade do LS deriva da presença de moléculas como lubricina, secretada por condrócitos, sinoviócitos e células meniscais (BAO; CHEN; WU, 2011), e AH, secretado por sinoviócitos. A rede hialurônica está intimamente relacionada com as propriedades do LS (MARTIN-ALARCON; SCHMIDT, 2016), enquanto sua tribologia é determinada pelas glicoproteínas lubrificantes (SVALA et al., 2017), as quais garantem a manutenção parcial das propriedades do LS mesmo após a destruição da rede hialurônica (JAY; WALLER, 2014). Recentemente foi demonstrado que o perfil de glicosilaçao da lubricina está alterado em articulações osteoartríticas (SVALA et al., 2017), e que tanto sua concentração no LS quanto sua expressão pela membrana sinovial aumentam nas articulações em resposta a inflamação

aguda de ocorrência natural e induzida (SVALA et al., 2015), principalmente nos locais mais danificados, caracterizados pela presença de fissuras, fibrilações e perda de proteoglicanos. Ainda, a lubricina foi encontrada nos tecidos cicatriciais, sugerindo ser um importante mediador no reparo e cicatrização cartilagíneos (REESINK et al., 2017).

O LS contém, ainda, moléculas solúveis como citocinas e fatores de crescimento, que além de permitirem a comunicação entre as diferentes populações celulares da articulação, como condrócitos e células sinoviais, também atuam como fatores regulatórios para as mesmas (BLEWIS et al., 2010). Tais moléculas podem ser derivadas do próprio plasma ou secretadas por condrócitos, células sinoviais ou outras populações celulares dos tecidos adjacentes. Entre as citocinas pró-inflamatórias do LS destacam-se a IL-1 β , interleucina 6 (IL-6) e TNF α (DOSS et al., 2007). Citocinas anti-inflamatórias incluem interleucina 10 (IL-10). Dentre os fatores de crescimento encontrados estão fator de crescimento transformador β (TGF β) e fator de crescimento insulina (IGF) (PEFFERS et al., 2015). Proteínas de ligação também estão presentes e desempenham importante papel na regulação celular. A manutenção desta composição é fundamental para preservação de suas propriedades e funções, além de garantir a homeostase articular (HUI et al., 2012).

2.3 DOENÇAS ARTICULARES

A destruição tecidual articular ocorre quando a síntese é excedida pelo processo de degradação, resultando na quebra da MEC cartilagínea e redução da síntese de seus componentes pelos condrócitos (CHU; ANDRIACCHI, 2015; TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017; ZHANG; EGAN; WANG, 2015). Uma vez instalado o processo traumático e/ou inflamatório na membrana sinovial, os sinoviócitos iniciam a produção e liberação no LS de radicais livres, prostaglandinas, citocinas inflamatórias (principalmente IL-1 β e TNF α), agrecanase e MMPs (estromelisina, colagenase, gelatinase), que digerem a MEC (PEFFERS et al., 2014; SHAH et al., 2017).

Na cartilagem articular, sob influência direta do trauma e das citocinas IL-1β e TNFα do LS, os condrócitos produzem EROs, prostaglandinas, MMPs, serina protease, ativadores de plasminogênio tecidual e uroquinase, contribuindo ainda mais para a degradação da MEC (FUNATO et al., 2017; MCILWRAITH, 2005; TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017). Neste momento ocorre a ativação da caspase, que induz a apoptose das células capazes de reparar a MEC (ZAMLI; SHARIF, 2011). Os condrócitos por sua vez entram novamente no processo de diferenciação, tornando-se hipertróficos, aumentando seu metabolismo e estimulando ainda

mais a produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF α (KAMM; NIXON; WITTE, 2010; ZHANG; EGAN; WANG, 2015) e a expressão de MMPs e agrecanases (DEJICA et al., 2012; TROEBERG; NAGASE, 2012; PINILLA et al., 2017), responsáveis pela quebra do agrecam (FRISBIE et al., 2008; HUI et al., 2012; NEUNDORF et al., 2010; PEFFERS; THORNTON; CLEGG, 2016) e destruição dos feixes de colágeno (HEINEMEIER et al., 2016; MORT et al., 2016; NEUNDORF et al., 2010; PUHAKKA et al., 2015). No estudo *in vitro* realizado por Svala et al. (2015) foram comprovadas a produção de MMPs, proteínas de fase aguda e IL-6 pela cartilagem articular equina estimulada com IL-1 β . Ainda, os autores observaram que a fragmentação do agrecam ocorre concomitantemente com a fragmentação do colágeno pouco tempo após o estimulo inflamatório, similar aos estágios iniciais da OA. A destruição da rede colágena foi observada posteriormente, a semelhança dos estágios crônicos de OA.

A clivagem do agrecam promove a perda de GAGs da cartilagem para o espaço articular (BERTUGLIA et al., 2016a; LACOURT et al., 2012; NEUNDORF et al., 2010; PEFFERS; THORNTON; CLEGG, 2016; PUHAKKA et al., 2015; ROUGHLEY; MORT, 2014; SOBAL et al., 2016; SVALA et al., 2015), além de desempenhar papel critico na regulação da resposta inflamatória articular, particularmente na ativação dos macrófagos (DAGHESTANI; PIEPER; KRAUS, 2015; ORLOWSKY; KRAUS, 2015). Estas células protegem o ambiente contra infecções e lesões pela detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao perigo endógeno (DAMPs), ativando respostas inflamatórias que resultam na liberação de citocinas e MMPs (CUNHA et al., 2017).

A contribuição dos efeitos pró-algésicos das citocinas foi recentemente reportada. TNF α e IL-1 β podem contribuir para a hiperexcitabilidade de fibras tipo C não mielinizadas de pequeno diâmetro, responsáveis pela transmissão de sinais dolorosos de tecidos periféricos ao tronco dorsal ganglionar, enquanto a IL-6 sozinha aumenta a resposta neuronal a substancia P (MILLER; MILLER; MALFAIT, 2014; VAN WEEREN, 2016). Na espécie equina, todavia, ainda não está clara a correlação entre as concentrações de TNF α e a escala clínica de dor articular (BERTUGLIA et al., 2016a).

2.3.1 Osteocondrose (OC)

Em 1887, König propôs a terminologia "osteocondrite dissecante" (OCD) para lesões abaixo da cartilagem articular que facilitavam a formação e o desprendimento de fragmentos na ausência de traumas significativos (WAGONER; COHN, 1931). Posteriormente, o termo osteocondrose (OC) foi considerado mais apropriado para estas lesões, que não apresentavam caráter inflamatório como condição primaria (EDMONDS; POLOUSKY, 2013; YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007). Em 1978 foi compreendido que a OCD é um evento subjacente ao processo de OC (OLSSON; REILAND, 1978). Condições osteocondrais juvenis é a nova classificação proposta para a antiga terminologia "doenças ortopédicas do desenvolvimento" proposta por McIlwraith em 1986, e engloba as lesões que ocorrem diretamente como resultado da OC, as fraturas por avulsão durante a ossificação e fisite (DENOIX et al., 2013a; PEAT; KAWCAK, 2015).

Os primeiros dois anos de vida são considerados como a faixa etária para o aparecimento das condições osteocondrais juvenis (DENOIX et al., 2013a; JACQUET et al., 2013; ROBERT et al., 2013), no entanto, algumas lesões que se desenvolvem dentro deste intervalo de tempo podem não se manifestar clinicamente até o início dos treinamentos (MCCOY et al., 2013; PEAT; KAWCAK, 2015). Uma vez que no mercado equino os animais são rotineiramente submetidos a exames radiográficos de compra e venda, o diagnóstico de OC pode ocorrer antes da manifestação dos sinais clínicos (ROBERT et al., 2013; VAN WEEREN; DENOIX, 2013). A prevalência de fragmentos osteocondrais detectáveis radiograficamente tem sido objeto de diversos estudos (DENOIX et al., 2013b; JACQUET et al., 2013; LEPEULE et al., 2013a). Em uma população de mais de 9000 cavalos, as alterações radiográficas foram observadas em mais de 30% dos animais, sendo as lesões de OCD encontradas em 14% da população (HILLA; DISTL, 2013). Mais recentemente, outro estudo utilizou uma população de 309 cavalos lusitanos e encontrou frequência de 48% (BOADO; LOPEZ-SANROMAN, 2016).

OC é uma enfermidade multifatorial que envolve falha focal da ossificação endocondral da cartilagem de crescimento epifisária ou metafisaria (LAVERTY; GIRARD, 2013; MCCOY et al., 2013). Seu caráter hereditário tem sido evidenciado em diversos estudos (DESJARDIN et al., 2014; DISTL, 2013; MCCOY et al., 2016; RICARD et al., 2013; WELSH et al., 2013), assim como a velocidade de crescimento e a influência da atividade física nas primeiras semanas de vida do potro (DONABEDIAN et al., 2008; LEPEULE et al., 2013b; PRAUD et al., 2013; VAN WEEREN, 2012; VAN WEEREN; DENOIX, 2013).

A ossificação endocondral é o processo de proliferação da cartilagem hialina e sua substituição gradual por tecido ósseo, fundamental para o desenvolvimento, crescimento e reparo dos ossos longos (HUNZIKER; KAPFINGER; GEISS, 2007; SEMEVOLOS, 2017). É iniciada pela formação da placa de crescimento, estrutura transitória constituída por células progenitoras mesenquimais que condensam e se diferenciam em condrócitos (LAVERTY; GIRARD, 2013). Dentro da placa de crescimento, hormônios, moléculas da MEC, proteases,

fatores de crescimento e de transcrição (DESJARDIN et al., 2014; KINSLEY; SEMEVOLOS; DUESTERDIECK-ZELLMER, 2015; POWER et al., 2014; RIDDICK; DUESTERDIECK-ZELLMER; SEMEVOLOS, 2012; SERTEYN et al., 2010) orquestram o processo de diferenciação, proliferação, maturação, hipertrofia e morte dos condrócitos (CHAGIN; KRONENBERG, 2014; DUESTERDIECK-ZELLMER et al., 2015).

A nutrição da cartilagem em crescimento é feita por vasos sanguíneos originários do pericôndrio, que correm paralelamente a superfície articular dentro de canais cartilagíneos (BLUMER et al., 2005; OLSTAD et al., 2008a,b). Nos cavalos, estes canais cartilagíneos estão presentes durante a vida fetal e desaparecem por volta dos sete meses de idade (CARLSON; CULLINS; MEUTEN, 1995; OLSTAD et al., 2008a,b; SHINGLETON et al., 1997), à medida que a ossificação endocondral progride e a ossificação avança na direção da superfície articular, quando o suprimento sanguíneo passa a ser pela cavidade medular (LECOCQ et al., 2008). Particularmente neste momento a vascularização é propensa a falhas e vulnerável a insultos (OLSTAD et al., 2008a,b, 2011; OLSTAD; EKMAN; CARLSON, 2015; YTREHUS et al., 2004a, b).

Na OC, alterações microvasculares focais levam a isquemia, retenção dos núcleos de cartilagem e consequente condronecrose (YTREHUS et al., 2004a, c; OLSTAD et al., 2008a,b, 2009, 2011; PRAUD et al., 2013), interrompendo a cascata fisiológica de eventos (LAVERTY; GIRARD, 2013). Anatomicamente, os locais predispostos apresentam padrão vascular distinto, resultando no atraso da ossificação endocondral (MARTEL et al., 2016a). A transecção experimental dos vasos sanguíneos da cartilagem epifisária em potros resultou em necrose isquêmica de veias e condrócitos, sendo observado atraso na ossificação endocondral nas áreas de condronecrose isquêmica (OLSTAD et al., 2013). A condronecrose secundaria a interrupção dos canais cartilagíneos e baixo suprimento sanguíneo também foi evidenciada em potros por Olstad, Ekman e Carlson (2015). A detecção de hematoidina, produto de degradação da hemoglobina em condições com baixa tensão de oxigênio, em áreas com esclerose subcondral excessiva e esclerose esponjosa e/ou densidade óssea irregular é relatada (PINILLA et al., 2017), sugerindo a deficiente perfusão sanguíneo das áreas em questão.

Inicialmente, as células mesenquimais se diferenciam em condrócitos pequenos, uniformes e com baixa taxa proliferativa, conhecidos como condrócitos de repouso, responsáveis pela expressão de componentes típicos da cartilagem, como colágeno II, IX e XI e agrecam (CHAGIN; KRONENBERG, 2014). Diferenças na expressão genica destes condrócitos adjacentes aos canais cartilagíneos foram encontradas em cavalos com OCD (RIDDICK; DUESTERDIECK-ZELLMER; SEMEVOLOS, 2012; KINSLEY; SEMEVOLOS; DUESTERDIECK-ZELLMER, 2015), resultando na expressão de fibras colágenas estruturalmente modificadas (LECOCQ et al., 2008) e mais suscetíveis ao desenvolvimento da enfermidade (LAVERTY; GIRARD, 2013; VAN WEEREN; JEFFCOTT, 2013).

Posteriormente, no estágio proliferativo, os condrócitos se dividem diversas vezes e expressam diversos tipos de colágeno e agrecam (DREIER, 2010; CHAGIN; KRONENBERG, 2014). A diferenciação em condrócitos hipertróficos induz a produção de colágeno tipo X (SEMEVOLOS, 2017) e a expressão de MMPs, fosfatase alcalina, fatores de crescimento (GOLDRING; TSUCHIMOCHI; IJIRI, 2006; MWALE et al., 2002), contribuindo para a calcificação da matriz adjacente (SEMEVOLOS, 2017). Depois da invasão de vasos sanguíneos para o osso subcondral, a maioria das células hipertróficas sofrem apoptose, havendo o remodelamento cartilagíneo dentro das trabéculas ósseas (YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007). Defeitos na diferenciação hipertrófica terminal podem resultar em falha da síntese e mineralização da MEC, alterando as propriedades cartilagíneas e ósseas, tornando a articulação propensa a fraturas (DESJARDIN et al., 2014). A anormalidade da matriz tem sido apontada como fator significativo no desenvolvimento da OC (LAVERTY et al., 2002; LECOCQ et al., 2008; MIRAMS et al., 2009; RIDDICK; DUESTERDIECK-ZELLMER; SEMEVOLOS, 2012; LAVERTY; GIRARD, 2013)

As áreas condronecróticas na camada intermediaria da cartilagem em crescimento são as primeiras alterações histológicas da então denominada OC *latens* (OLSTAD et al., 2009, 2011; OLSTAD; EKMAN; CARLSON, 2015). Quando a ossificação avança e circunda a área condronecrotica, ocorre a OC *manifesta* (YTREHUS et al., 2004a, b). São áreas mais suscetíveis às forças mecânicas (MCCOY et al., 2013), caracterizadas pela perda de proteoglicanos e irregularidades na superfície cartilagínea (DESJARDIN et al., 2014). Alguns estudos sugerem que a repetição do impacto provoque microtraumas que possam ser a causa da fragmentação osteocondral (VAN GREVENHOF et al., 2009) e a transformação em OC *manifesta* em dissecante (VAN WEEREN; BARNEVELD, 1999; YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007). A lesão dissecante resulta de um flap cartilagíneo (MCCOY et al., 2013), que pode se destacar e se tornar um fragmento livre dentro da articulação (LAVERTY; GIRARD, 2013). Alternativamente, o impacto mecânico continuo sobre as áreas condronecroticas pode levar ao desenvolvimento de cistos subcondrais (OLSTAD et al., 2015). Variações no impacto e na distribuição da tensão nas diferentes articulações podem explicar a ocorrência de lesões distintas (DENOIX et al., 2013a).

A influência da atividade atlética na patogênese da OC não é totalmente elucidada, sendo proposto um papel secundário para tal (MCCOY et al., 2013). Ao mesmo tempo que o exercício controlado parece reduzir o risco de desenvolvimento desta afecção em potros (LEPEULE et al., 2009), não é capaz de impedir sua ocorrência, afetando apenas a distribuição das lesões (SEMEVOLOS, 2017; VAN WEEREN; BARNEVELD, 1999). O papel do trauma na etiologia também é questionado pela ocorrência de lesões em locais anatômicos não expostos ao aumento do estresse durante a atividade física (OLSTAD et al., 2007). É proposto que a oclusão vascular decorrente da septicemia ocorra em cavalos (HAGGETT et al., 2012).

Cavalos que iniciam a vida esportiva até os dois anos de idade tendem a apresentar carreira mais longa e bem-sucedida (TANNER et al., 2011), uma vez que o condicionamento precoce do sistema musculo esquelético diminui a propensão de ferimentos ou doenças. Portanto, a presença de condições osteocondrais juvenis pode afetar negativamente a carreira destes animais (VAN WEEREN; DENOIX, 2013), tornando o diagnóstico precoce extremamente importante. A ultrassonografia em potros pode ser útil no diagnóstico da OC manifesta, porque avalia com precisão a topografia das lesões, além de permitir o acompanhamento do processo de ossificação endocondral fisiológico ou patológico (MARTEL et al., 2017). Frequentemente as lesões são diagnosticadas por radiografia (DENOIX et al., 2013b). Os achados radiográficos incluem a presença de flap osteocondral ou fragmento, superfície articular irregular ou diminuída, lucência no osso subcondral e esclerose circundante, enquanto as manifestações clinicas geralmente são efusão articular e claudicação (BOADO; LOPEZ-SANROMAN, 2016; OLSTAD et al., 2013; WRIGHT; MINSHALL, 2014).

A detecção precoce de OC em cavalos tem sido relatada pela mensuração de biomarcadores séricos, sinoviais e sanguíneos (BILLINGHURST et al., 2004; CHIARADIA et al., 2012; DE GRAUW et al., 2011; DONABEDIAN et al., 2008), havendo correlação com aumento nas concentrações séricas de osteocalcina, bem como os produtos séricos do metabolismo do colágeno e da mineralização óssea, apresentando também correlação positiva com a severidade da OC quando combinados com exames radiográficos (BILLINGHURST et al., 2004; DONABEDIAN et al., 2008). Os biomarcadores sinoviais associados com a OC em potros são produtos do *turnover* do colágeno e agrecam (BROSSI, 2014; DE GRAUW et al., 2011; LAVERTY et al., 2002). O marcador CS846 do agrecam aparece em baixas concentrações em articulações osteocondróticas, juntamente com IGF-1 (DE GRAUW et al., 2011). A análise proteômica do LS de potros de 12 a 18 meses portadores de OC revelou o envolvimento das vias da inflamação, coagulação, estresse oxidativo e danos da matriz, semelhantemente ao encontrado na OA (CHIARADIA et al., 2012). Neste contexto, a OCD é
um importante fator de risco para o desenvolvimento de OA, conforme demonstrado por Machado et al. (2012).

2.3.2 Osteoartrite (OA)

Em 1938, a artrite degenerativa foi reportada pela primeira vez na espécie equina, e suas alterações patológicas comparadas com a OA humana (CALLENDER; KELSER, 1938). Embora o exame das articulações osteoartríticas estivesse limitado nas observações morfológicas (CALLENDER; KELSER, 1938; NILSSON; OLSSON, 1973), em 1966 a enfermidade ganhou destaque clinicamente e foi relacionada com a claudicação, sendo o agente etiológico central atribuído ao trauma (MCILWRAITH, 2005). Em 1975 as lesões cartilagíneas foram consideradas critério indispensável, apesar de nem sempre serem o evento central da doença clínica. Atualmente, é considerada um grupo de enfermidades distintas sobrepostas que podem ter diferentes etiologias, mas são caracterizadas por um estágio final comum: a deterioração progressiva da cartilagem acompanhada por alterações ósseas e de partes moles articulares (BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2008; MCILWRAITH, 2005).

A OA equina é uma enfermidade multifatorial, promovida por alterações mecânicas e biológicas que podem iniciar um processo patológico na membrana sinovial ou induzir a fibrose da capsula articular, osso subcondral e ligamentos, bem como da cartilagem articular, ou uma combinação destes fatores (APPLETON, 2017; SMITH et al., 2008; FINDLAY; KULIWABA, 2016; TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017). Comumente, a aplicação súbita de força mecânica na superfície articular é apontada como fator predisponente, sendo a extensão do dano mecânico diretamente proporcional a intensidade do impacto (FRAZER et al., 2017; MCCARTY et al., 2015, 2016; PEAT; KAWCAK, 2015). Estudos recentes têm comprovado o papel benéfico do exercício controlado na manutenção da saúde articular, enquanto o treinamento prolongado de alto impacto se apresenta como importante fator de risco para lesão articular (BERTUGLIA et al., 2016a; LAMPRECHT; WILLIAMS, 2012; MA et al., 2018; REED et al., 2013; TURLEY et al., 2014). A predisposição de algumas articulações em desenvolver a enfermidade ocorre, principalmente, por características anatômicas intrínsecas relacionadas a absorção do impacto e dissipação da energia (NOVAKOFSKI et al., 2015).

Anormalidades cartilagíneas podem ser decorrentes do envelhecimento (CHU; ANDRIACCHI, 2015; RAHMATI et al., 2017), da OC (MACHADO et al., 2012), da presença de tecido cicatricial e/ou sinovite e capsulite, provenientes de impactos repetitivos (TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017). Uma vez fragilizada, a cartilagem torna-se incapaz de absorver, distribuir e transmitir as forças compressivas incidentes sobre ela, sendo o menor estimulo mecânico capaz de promover a diminuição da síntese dos componentes da matriz e a degradação enzimática de proteoglicanos e colágeno, diretamente ou secundária a interação de citocinas (FUNATO et al., 2017; MCILWRAITH, 2005; MCILWRAITH, FRISBIE; KAWCAK, 2012b).

Por outro lado, também pode ocorrer a incidência de altas forças mecânicas sobre a cartilagem saudável. A perda de estabilidade e alterações na simetria articular ocasionadas por fraturas e/ou doenças do desenvolvimento, bem como a repetição de impactos levando a remodelamento, microfraturas e até mesmo necrose isquêmica do osso subcondral são apontados como responsáveis por sobrecarregarem a cartilagem normal (FRAZER et al., 2017; MURATOVIC et al., 2018; REED et al., 2012;). Em resposta ao estimulo mecânico aberrante, o osso subcondral aumenta em espessura e densidade, amplificando o estresse na base da cartilagem articular pelas forças de cisalhamento (GOLDRING; GOLDRING, 2016; LACOURT et al., 2012; MCCARTY et al., 2016; POURAN et al., 2017). Neste caso, a agressão ocorre diretamente na estrutura do colágeno por ação da catepsina K (DEJICA et al., 2012; MORT et al., 2016; NEUNDORF et al., 2010), levando a perda secundaria progressiva de proteoglicanos da MEC. Além disso, a lesão física celular estimula a degradação enzimática de proteoglicanos e colágeno, assim como a diminuição da síntese de componentes da MEC (FUNATO et al., 2017; LUCIA et al., 2013; MCILWRAITH, 2005; KAHN et al., 2017).

Sinovite e capsulite consistem os problemas mais comuns nas articulações com OA e contribuem para o processo de degradação cartilagínea pela liberação de enzimas, mediadores inflamatórios e citocinas (BOYCE et al., 2013; TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017; WANG et al., 2017). A importância da inflamação da membrana sinovial na patogênese da OA equina foi reportada por estudos experimentais (ANDREASSEN et al., 2017; BARRACHINA et al., 2016; MCILWRAITH; VAN SICKLE, 1981; NEUENSCHWANDER, 2016) que a demonstraram que a degradação da cartilagem pode ocorrer na ausência de instabilidade ou traumas teciduais, e que a perda de GAGs está associada à ruptura inicial da superfície cartilagínea e à degradação da MEC. Desde então, vários estudos têm reconhecido e demonstrado a importância da sinovite e capsulite na produção de dor e desconforto nos cavalos, bem como no aumento da produção de mediadores contribuintes para o processo osteoartrítico (BROSSI, 2014; CREMA et al., 2017; MCILWRAITH et al., 2017).

Patologias dos meniscos são diretamente proporcionais a idade e estão fortemente correlacionadas com o aparecimento da OA humana (BROPHY et al., 2012; CHU; ANDRIACCHI, 2015) e equina (DUBUC et al., 2018), bem como as disfunções mitocondriais

(DESJARDIN et al., 2014), uma vez que a mitocôndria prejudicada desempenha papel fundamental na produção de EROs, envolvidas na morte de condrócitos e digestão da MEC (FUNATO et al., 2017).

A OA promove mudanças morfológicas, bioquímicas, moleculares e biomecânicas nas células e na MEC (PUHAKKA et al., 2015), culminando um processo patológico progressivo e permanentemente deteriorante não restrito somente a cartilagem articular, mas que engloba a articulação de maneira geral e tecidos periarticulares (CHU; ANDRIACCHI, 2015; FINDLAY; KULIWABA, 2016; MANINCHEDDA et al., 2015; NEUNDORF et al., 2010; VAN WEEREN; BACK, 2016). A degeneração cartilagínea leva ao aumento da permeabilidade, permitindo o influxo de água e o desarranjo das fibras colágenas (MÄKELÄ et al., 2015; NICKIEN; THAMBYAH; BROOM, 2017). Os achados histológicos como fibrilações, fissuras, agrupamento e morte de condrócitos ao redor das áreas mais desgastadas são diretamente proporcionais correlacionados com os piores escores clínicos, radiográficos e artroscópicos (BOYCE et al., 2013).

As fibrilações viram fissuras que evoluem para ulceração e, por fim, perda da espessura da superfície articular com exposição do osso subcondral e formação de osteófitos (DE LASALLE et al., 2016; DUBUC et al., 2018; MANINCHEDDA et al., 2015; NEUNDORF et al., 2010; TURLEY et al., 2014; VAN WEEREN; BACK, 2016). A exposição induz a esclerose do osso subcondral, o que implica na absorção de maiores cargas compressivas, intimamente relacionadas ao aparecimento de microfraturas (MALEKIPOUR et al., 2013; MALEKIPOUR; OETOMO; VEE-SIN LEE, 2016). Dentre as principais alterações clínicas estão a claudicação, efusão articular com aumento da circunferência e diminuição da viscosidade do LS (BOYCE et al., 2013; KAHN et al., 2017; MANINCHEDDA et al., 2015; MCILWRAITH; FRISBIE; KAWCAK, 2012b; REED et al., 2012; SHAH et al., 2017; VAN WEEREN; BACK, 2016).

2.3.2.1 Classificação da OA

A graduação da OA tem sido realizada por meio da artroscopia e biomarcadores relacionados as lesões cartilagíneas macroscópicas e histológicas. Neundorf et al. (2010) se basearam no aspecto macroscópico da articulação e classificaram como: leve, as alterações como opacidade, hipertrofia, desgaste e adelgaçamento cartilagíneos e alargamento das fossas sinoviais; médio grau, erosão, fibrilação e presença de osteofitos, e grave: alterações da espessura cartilagínea, fissuras, necrose, presença de tecido fibroso e hematomas subcondrais.

A radiografia é o método complementar mais utilizado para diagnosticar e monitorar a progressão da OA (BOYCE et al., 2013; MANINCHEDDA et al., 2015; REED et al., 2012). Embora existam diversos sistemas de classificação baseados na radiografia, poucos estudos investigaram a confiabilidade das escalas de classificação ou sua correlação com o real grau de degeneração da cartilagem articular (AGRESTE em dados não publicados; DE LASALLE et al., 2016; SILVA, 2014). Em humanos, um estudo epidemiológico descritivo realizado por Wright et al. (2014) comparou as diversas alterações radiográficas de OA com as alterações articulares observadas diretamente durante a artroscopia para reconstrução do ligamento cruzado cranial. Os autores demonstraram que os sistemas de classificação radiográficos comumente utilizados, em sua grande maioria baseados na diminuição do espaço articular, têm boa confiabilidade e correlação com os achados artroscópicos.

Bertuglia et al. (2016a) realizaram um estudo coorte longitudinal e transversal utilizando cavalos de corrida com fratura traumática espontânea. Os autores criaram uma escala semiquantitativa para avaliar a severidade da OA cujo intervalo varia de zero a 33 pontos. Os animais foram acompanhados e avaliados anualmente durante cinco anos, sendo observado aumento progressivo do escore radiográfico previamente acompanhado do aumento das concentrações de TNFa no LS. Maninchedda et al. (2015) criaram um modelo de OA a partir da confecção de sulcos na cartilagem, e a severidade das alterações radiográficas foi quantificada em escala de 0 a 2, sendo 0:normal; 1: leve a moderado; 2: grave. Os parâmetros avaliados foram efusão sinovial, osteofitos, esclerose do osso subcondral e tamanho do espaço articular, sendo a média final dos escores significativamente maior nas articulações induzidas após 10 semanas. Tal diferença ocorreu principalmente pela efusão sinovial e osteofitos. Em estudo semelhante realizado por Boyce et al. (2013), fragmentos osteocondrais foram criados em articulações MCF e, após 16 semanas, as alterações radiográficas mais significativas foram a presença de entesofitos e efusão articular. Aparentemente, a esclerose do osso subondral não é um parâmetro radiográfico confiável para a monitoração da OA (DE LASALLE et al., 2016; MANINCHEDDA et al., 2015).

Percebendo a importância de determinar em que momento da evolução das doenças articulares não-infecciosas os animais apresentavam grau de alterações que inviabilizassem o retorno as atividades atléticas, Silva (2014) e Agreste (em dados não publicados) criaram um escore classificatório da gravidade da doença utilizando meios de avaliação clínica de rotina. Silva (2014) correlacionou as informações de anamnese, exame físico, radiográfico, ultrassonográfico e as alterações observadas durante a artroscopia de 126 articulações com OA e/ou OC e propôs um escore cujas mais altas pontuações correspondem as mais graves lesões.

Já Agreste (em dados não publicados) avaliou o aspecto macroscópico da membrana sinovial de cavalos com OA e OC durante a artroscopia para criar uma escala classificatória, e comparou com a histopatologia e expressão de biomarcadores no liquido e membrana sinovial a fim de instituir um padrão de prognostico relacionado a gravidade das doenças, bem como referências que possam orientar o melhor tratamento. Esta autora concluiu que maior número de alterações na membrana sinovial ocorreu nas articulações com OA quando comparadas ao grupo OC e ao grupo controle. Também, as articulações com OA apresentaram menor expressão genica e menor concentração de IL-10, e maior concentração de IL-1 e IL-6.

2.3.3 Fraturas intra-articulares

Cavalos atletas são criados para o desempenho, tornando a performance o parâmetro mais importante na avaliação do impacto de qualquer doença ou anormalidade, além de possíveis influências no bem-estar animal (VAN WEEREN; DENOIX, 2013). Lesões musculoesqueléticas especificamente nestes animais são multifatoriais e incluem fatores biológicos e não biológicos (ALLEN et al., 2017; DELAY, 2017; MACKINNON et al., 2015; MAEDA, HANADA, OIKAWA, 2016; ROSANOWSKI et al., 2017; WYLIE et al., 2017).

Durante o trote e galope, as forças verticais e horizontais incidentes sobre os membros torácicos aumentam significativamente, contribuindo para a prevalência de lesões nestas articulações (WYLIE et al., 2017). Assim, as articulações cárpicas e MCF são as articulações de ocorrência mais comum de artropatias em cavalos de corrida (ALLEN et al., 2017; DELAY, 2017; DUBOIS et al., 2014; JANES et al., 2017; MAEDA, HANADA, OIKAWA, 2016; MIYAKOSHI et al., 2017). Tais articulações, assim como as metatarsofalangeanas (MTF), são consideradas de intenso movimento e recebem grande impacto durante o exercício, além da proximidade das pequenas superfícies articulares, que podem rapidamente desenvolver sinovite, erosões e fissuras associadas a fragmentação osteocondral (ENGILES et al., 2017; JANES et al., 2017; MCCARTY et al., 2015; NEUNDORF et al., 2010). A concussão intensa e repetida aumenta a densidade óssea nas articulações MCF e MTF e das articulações cárpicas, respectivamente, reduzindo a capacidade de dissipação de energia e aumentando a suscetibilidade a fraturas patológicas (NOBLE; SINGER; JEFFERY, 2016; NOVAKOFSKI et al., 2015; TRANQUILLE; MURRAY; PARKIN, 2017).

O exercício físico intenso inibe o remodelamento fisiológico do osso subcondral (DUBOIS et al., 2014; WILLIAMSON et al., 2017) que, ao contrário do que se imaginava, não é dependente da apoptose dos osteócitos (HOPPER; SINGER; HENSON, 2018).

Consequentemente, ocorre intensa reabsorção focal do osso subcondral e cartilagem calcificada (MARTIG et al., 2014; NOBLE; SINGER; JEFFERY, 2016; PINILLA et al., 2017; TRANQUILLE; MURRAY; PARKIN, 2017) acompanhada de baixa perfusão sanguínea, culminando em alterações isquêmicas progressivas (MIYAKOSHI et al., 2017; PINILLA et al., 2017; TURLEY et al., 2014) que modificam as propriedades mecânicas de ambos, permitindo o acumulo de lesões (FRAZER et al., 2017). Neste caso, as fraturas patológicas ocorrem pela fadiga do osso subcondral, caracterizada pela coalescência de microfraturas iniciadas na superfície articular da cartilagem calcificada (DUBOIS et al., 2014; HITCHENS et al., 2017; HOPPER; SINGER; HENSON, 2018).

Os sinais clínicos iniciais incluem claudicação em função da dor associada a severa efusão (MACKINNON et al., 2015). A gravidade dos achados radiográficos geralmente está associada a uma vida atlética curta (MIYAKOSHI et al., 2017; ROBERT et al., 2013). Se não tratadas, as fraturas podem evoluir para OA, uma vez que o fragmento causa erosão cartilagínea levando ao adelgaçamento parcial da mesma (BOYCE et al., 2013). Além das fraturas, lesões relacionadas ao estresse associadas a tendões e ligamentos podem ocorrer isoladas ou em conjunto com a fragmentação osteocondral, levando a instabilidade articular e desenvolvimento secundário da OA (ALLEN et al., 2017; LACOURT et al., 2012; WYLIE et al., 2017).

4 OBJETIVOS

Caracterizar o comportamento dos biomarcadores do LS nas diferentes enfermidades articulares equinas.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Quantificar as concentrações de IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10 e PGE₂ no LS de equinos hígidos, com fratura intra-articular, OA e OC.

Detectar e quantificar as concentrações de AH, CS e KS no LS de equinos hígidos, com fratura intra-articular, OA e OC.

Determinar o peso molecular do AH do LS de equinos hígidos, com fratura intraarticular, OA e OC.

Avaliar a sensibilidade e especificidade de cada biomarcador e criar um painel com o comportamento característico de cada um nas diferentes enfermidades articulares de natureza traumática, inflamatória e degenerativa, comparando com os animais hígidos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme o protocolo de número 2562060214.

As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no Laboratório Especializado em Análises Científicas (LEAC) e no Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

5.1 ANIMAIS

Este foi um estudo prospectivo em que animais portadores de fraturas intra-articulares, OA ou OC, atendidos pelo serviço de Clínica Médica de Equinos e pelo Serviço de Cirurgia de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no período entre novembro de 2013 e dezembro de 2017, foram comparados com animais hígidos (grupo Controle). Os animais foram alocados da seguinte maneira nos diferentes grupos:

- Grupo Fratura 45 articulações cárpicas de 22 equinos, machos e fêmeas, com idade entre dois e seis anos, diagnosticados com fratura intra-articular durante treinamento ou corrida e submetidos a artroscopia (Quadro 1).
- Grupo OA 1 17 articulações de 17 equinos, machos e fêmeas, com idade entre três e 12 anos, diagnosticados com OA grau leve (Quadro 2).
- Grupo OA 2 13 articulações de 13 equinos, machos e fêmeas, com idade entre três e 15 anos, diagnosticados com OA grau moderado, submetidos ou não a artroscopia (Quadro 3).
- Grupo OA 3 11 articulações de 10 equinos, machos e fêmeas, com idade entre seis meses e 14 anos, diagnosticados com OA grau severo, submetidos ou não a artroscopia (Quadro 4).
- Grupo OC 80 articulações de 55 equinos, machos e fêmeas, com idade entre um a sete anos, diagnosticados com OCD e submetidos a artroscopia (Quadro 5).
- Grupo Controle 51 articulações de 16 equinos hígidos, não atletas, machos e fêmeas, com idade entre dois e quatro anos, sem histórico de doenças articulares e sem alterações

compatíveis com doença articular nos exames físico, radiográfico e ultrassonográfico (Quadro 6).

O diagnóstico de higidez e classificação das enfermidades articulares foram determinados durante o exame do sistema locomotor, composto por avaliação física e técnicas de imagem, realizado pelo serviço de Clínica Médica de Equinos e pelo Serviço de Cirurgia de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo em todos os animais. As articulações estudadas foram interfalangeanas (IF), MCF, MTF, tibiotársicas (TT), cárpicas, escapuloumeral (EU) e femorotibiopatelar (FTP). LS das articulações acometidas foi coletado durante o exame clínico ou artroscopia.

ANIMAL	RAÇA	IDADE (ANOS)	SEXO	OSSO/ARTICULAÇAO
01	QM	2,5	F	IC
02	QM	2	F	CMTC
03	QM	3	М	RC
04	QM	4	М	IC, RC
05	QM	3	F	IC, RC
06	QM	6	F	IC, RC
07	QM	3	М	ICD, ICE, RCD, RCE
08	QM	3	М	RC, ICD, ICE
09	QM	3	М	IC, RC
10	QM	2,5	F	IC, RC
11	QM	3	М	IC, RC
12	QM	3	F	CE
13	QM	2	F	ICD, ICE
14	QM	3	М	RCD, RCE
15	QM	2,5	М	ICD, ICE, RCD, RCE
16	QM	2,5	F	ICD, ICE
17	QM	2,5	F	RC
18	QM	4	М	IC, RC
19	QM	3	М	IC, RC
20	QM	3	М	RCD, RCE, ICD, ICE
21	QM	4	F	IC
22	QM	3	М	RCD, RCE

Quadro 1 – Raça, idade e sexo dos animais do grupo Fratura – São Paulo – 2018.

IC: intercarpica; CMTC: carpometacarpica; RC: radiocarpica; ICD: intercarpica direita; ICE: intercarpica esquerda; RCD: radiocarpica direita; RCE: radiocarpica esquerda; QM: Quarto de Milha; F: femea; M: macho.

ANIMAL	RAÇA	IDADE (ANOS)	SEXO	ARTICULAÇAO
1	BH	3	F	FTP
2	BH	12	F	IFP
3	SB	12	F	MCF
4	ML	12	F	TT
5	QM	8	F	MCF
6	PSL		М	MCF
7	ML	11	М	MCF
8	ML	3	F	TT
9	PSA	9	М	MCF
10	AT	3,5	F	TT
11	QM	8	F	RC
12	AT	10	М	MCF
13	ML	8	М	MCF
14		8	F	EU
15		6	М	MCF
16	MUAR	3	F	TT
17		4	F	MCF

Quadro 2 – Raça, idade e sexo dos animais do grupo OA1 – São Paulo – 2018.

FTP: femorotibiopatelar; IFP: interfalangeana proximal; MCF: metacarpofalangeana, TT: tíbiotarsica; RC: radiocarpica; EU: escapuloumeral; BH: Brasileiro de Hipismo; ML: Mangalarga; QM: Quarto de Milha, PSL: Puro Sangue Lusitano; PSA: Puro Sangue Árabe; AT: American Trotter; F: femea; M: macho.

ANIMAL	RAÇA	IDADE (ANOS)	SEXO	ARTICULAÇÃO
1	BH	11	М	MTF
2	SB	8	М	RC
3	SRD	14	F	MCF
4	APALOOSA	14	М	MCF
5	BH	3	М	TT
6			М	TT
7	AT	8	М	MTF
8	QM	3	F	MCF
9	PSL	10	М	MCF
10			М	MTF
11	BH	4	F	MCF
12	QM	15	М	MTF
13		6	М	MCF

Quadro 3– Raça, idade e sexo dos animais do grupo OA2 – São Paulo – 2018.

MTF: metatarsofalangeana; RD: radiocarpica; MCF: metacarpofalangeana; TT: tibiotársica; BH: Brasileiro de Hipismo; SB: Sela Belga; SRD: Sem Raça Definida; AT: American Trotter; QM: Quarto de Milha; PSL: Puro Sangue Lusitano; F: fêmea; M: macho.

ANIMAL	RAÇA	IDADE (ANOS)	SEXO	ARTICULAÇAO
1	SRD	14	F	MCF
2	SB	12	F	MCF
3	QM	3,5	F	RC
4	QM	3	F	MCF
5	ML	12	F	TT
6	PSI	1	F	EU
7	ML	0,5	F	MCF
8	AT	9	F	IFD, IFE
9	PSA	12	М	MCF
10		2	М	TT

Quadro 4 – Raça, idade e sexo dos animais do grupo OA3 – São Paulo – 2018

MCF: metacarpofalangeana; RC: radiocarpica; TT: tibiotársica; EU: escapuloumeral; IFD: interfalangeana direita; IFE: interfalangeana esquerda; SRD: Sem Raça Definida; SB: Sela Belga; QM: Quarto de Milha; ML: Mangalarga; PSI: Puro Sangue Inglês; AT: American Trotter; PSA: Puro Sangue Árabe; F: femea; M: macho.

ANIMAL	RAÇA	IDADE (ANOS)	SEXO	ARTICULAÇÃO
1	BH	2	М	TT
2	BH	2	М	TT
3	PSL	5	М	TT
4	PSL	1	М	TT
5	BH	3	М	MTF
6	BH	3	F	MTF
7	PSL	5	М	FTP
8	BH	1,5	М	TT
9	BH	4	М	MCF
10	BH	3	F	TT
11	SRD	5	М	MCF
12	BH	1	F	MTF
13	BH	3,5	М	FTP, MTF
14	PSL	7	М	TT
15	ML	1	F	EU
16	AT	8	М	MTFD, MTFE
17	QM	4	М	TT
18	PSL	1,5	М	TTD, TTE
19		1	F	TT
20	AT	2	М	TTD, TTE

Quadro 5 – Raça, idade e sexo dos animais do grupo OC – São Paulo – 2018. (continua)

21	QM	1	М	IC, RC
22	AT	7	F	MTF
23	ML	2	F	MCF
24	BH	2	F	TTD, TTE
25	BH	1	М	MTF
26	BH	2	F	TT
27	ML	2,5	М	TT
28	BH	3	М	FTP
29	PEGA	6	F	MCF
30	BH	5	F	TT, MCF
31	BH	2	М	TTD, TTE
32	BH	6	М	TTD, TTE
33	ML	1	F	TTD, TTE
34	BH	2	F	TTD, TTE
35	BH	1	М	TT
36	BH	1	М	FTP, MCF
37	HOLSTEIN	4	М	TTD, TTE, MCF
38	BH		М	TT
39	BH	3	М	TTD, TTE
40	BH	3,5	F	MTFD, MTFE
41	BH	3	М	MTF, TTD, TTE, MCF
42	AT	4	М	TT
43	PSL	3	М	TT
44	PSL	4	М	TTD, TTE
45	PSL	3	М	TTD, MCF, MTF
46	PSL	3	М	
47	BH	2	F	MTFD, MTFE
48	QM	3	F	MCF
49	SRD	6	М	MTF
50	QM	2,5	F	IC
51		6	М	TTD, TTE
52		1	М	TTD, TTE
53	BH	1	F	TT
54	BH	3,5	М	MTFD, MTFE
55	PSL	6	М	TT

TT: tibiotársica; MTF: metatarsofalangeana; FTP: femorotibiopatelar; MCF: metacarpofalangeana; EU: escapuloumeral; MTFD: metatarsofalangeana direita; MTFE: metatarsofalangeana esquerda; TTD: tibiotársica direita; TTE: tibiotársica esquerda; IC: intercarpica; RC: radiocarpica; BH: Brasileiro de Hipismo; PSL: Puro Sangue Lusitano; SRD: Sem Raça Definida; ML: Mangalarga; AT: American Trotter; QM: Quarto de Milha; F: femea; M: macho

ANIMAL	RAÇA	IDADE (ANOS)	SEXO	ARTICULAÇÃO
1	PSA	2,5	М	TTD, TTE, MCFD, MCFE
2	PSA	4	М	TTD, TTE, MCFD, MCFE
3	PSA	2	М	TTD, TTE, MCFD, MCFE
4	PSA	2	М	TTD, TTE, MCFD, MCFE
5	PSA	5	F	MCFD
6	PSA	4	М	TTD, TTE, MCFD, MCFE
7	PSA	5	F	MCFD, MCFE
8	PSA	2	М	TTD, TTE, MCFD, MCFE
9	PSA	4	М	TTD, TTE, MCFD, MCFE
10	PSA	3,5	М	TTD, TTE, MCFD, MCFE
11	PSA	2	М	TTD, TTE, MCFD, MCFE
12	PSA	2	М	TTD, TTE, MCFD, MCFE
13	PSA	2	М	TTD, TTE
14	PSA	2,5	М	TTD, TTE
15	PSA	2	М	TTD, TTE
16	PSA	3	М	TTD, TTE

Quadro 6 – Raça, idade e sexo dos animais do grupo Controle – São Paulo – 2018.

TTD: tibiotársica direita; TTE: tibiotársica esquerda; MCFD: metacarpofalangeana diretia; MCFE: metacarpofalangeana esquerda; PSA: Puro Sangue Árabe; F: fêmea; M: macho.

5.2 CLASSIFICAÇAO DAS OAS

A graduação das lesões para classificação da OA foi realizada com base nas análises das imagens radiográficas conforme proposto por Silva (2014) e adaptada para 0-12 pontos para este estudo conforme descrito no Quadro 7.

Quadro 7 – Parâmetros avaliados através do exame radiográfico e classificação proposta para as alterações encontradas – 2018.

5	(continua)
Presença de diminuição da interlinha radiográfica	Pontuação
Normal	0
Leve estreitamento com orientação simétrica ou assimétrica	1
Moderado estreitamento simétrico ou assimétrico mantendo a definição	2
Acentuado estreitamento com pouca definição	3
Indefinição da interlinha radiográfica	4
Evidência de osteófito e proliferações ósseas	
Nenhum	0
Discretas projeções ósseas entre as faces ósseas	1

Projeção óssea proeminente, organizada e localizada	2						
Projeção óssea proeminente, organizada e observada em mais de uma projeção							
Extensas projeções ósseas irregulares observadas em mais de uma projeção							
Evidência de entesófitos							
Nenhum	0						
Linhas ou discreta ponte de mineralização na topografia de inserção de capsula ou							
ligamentos	1						
Projeção óssea organizada e facilmente reconhecida na topografia de inserção de	2						
capsula ou ligamentos	2						
Projeção óssea evidente e irregular na topografia de inserção de capsula ou ligamentos	3						
Extensa reação óssea desorganizada na topografia de inserção de capsula ou	4						
ligamentos	-T						

Fonte: SILVA, 2014 modificado por MOREIRA, 2018.

Até quatro pontos as OAs foram consideradas grau leve (OA1), de cinco a oito pontos grau moderado (OA2) e de nove a 12 pontos grau severo (OA3).

5.4 LÍQUIDO SINOVIAL

Foram coletadas amostras de LS de todas as articulações submetidas ao bloqueio anestésico durante o exame clínico ou à artroscopia. Após cada coleta, as amostras de líquido sinovial foram imediatamente centrifugadas¹ a 4°C e 2000 x *g*, durante 15 minutos. O sobrenadante foi aliquotado em tubos de 2 ml e congelado a -80°C para futuras análises, validando o material para o biobanco de biomarcadores (MCILWRAITH et al., 2017).

5.4.1 Contagem celular

A contagem total de células nucleadas foi realizada em câmara de Neubauer², com alíquotas de líquido sinovial *in natura*. As amostras contaminadas com sangue foram diluídas na proporção de 10 μ l de LS para 90 ou 190 μ L de solução fisiológica 0,9%, e o número de células viáveis foi ajustado para x10 e x20, respectivamente.

¹ Centrífuga 5417 R – Eppendorf®

² Neubauer – Hirschmann – EM – Techcolor

5.4.2 Quantificação das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, e TNF-α e antiinflamatória IL-10

A quantificação das citocinas foi realizada por meio do kit MILLIPLEX ® MAP (Equine Cytokine/Chemokine Panel) da EMD Millipore Corporation, baseada na tecnologia Luminex xMAP®.

5.4.3 Quantificação da PGE2

A quantificação de PGE₂ do LS foi realizada por ELISA, com o *kit* Prostaglandin E₂ EIA Kit – Monoclonal (Ref.: 514010)³. Foram utilizadas as amostras de LS acondicionadas em tubos secos a -80°C.

EIA Buffer foi adicionado aos poços de ligação inespecífica (100 µl) e aos poços de máxima ligação (50 µl). A curva padrão foi feita em duplicata, adicionando 50 µl em cada poço das fileiras 2 e 3 da placa. Em seguida, 50 µl das amostras de LS foram adicionadas em cada poço, em duplicata. Com exceção dos poços de atividade total e branco, todos os demais receberam 50 µl de PGE_2 tracer, contendo acetilcolinesterase (AChE). O anticorpo monoclonal anti-PGE₂ foi adicionado na quantidade de 50 µl aos poços, com exceção dos poços de atividade total, ligação inespecífica e branco. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C e em seguida lavada cinco vezes com *Wash Buffer*. Foram adicionados 200 µl de *Ellman's Reagent*, preparado imediatamente antes de sua utilização, em todos os poços, e apenas o poço de atividade total recebeu também 5 µl de *tracer*. A placa foi protegida da luz e mantida no agitador por 60 a 90 minutos. A absorbância da amostra foi lida à 405 nm em leitor⁴ de microplaca e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 7.8 a 1000 pg/ml pelo programa Gen 5.

5.4.4 Quantificação do KS

As dosagens de KS das amostras de líquido sinovial foram realizadas utilizando-se o método ELISA. Para padronização da técnica vários ensaios foram realizados, visto a diversidade e funcionalidade dos anticorpos utilizados. O anticorpo primário⁵ reagiu muito bem

³ Cayman Chemical Company (EUA)

⁴ ELx808 - Biotek

⁵ MAB2022 – anti-keratan sulfate antibody, clone EFG-11

com KS ligado ao esqueleto proteico, mas praticamente não reconheceu o KS como cadeia livre. Por esta razão, houve a necessidade de usarmos o proteoglicano de núcleo pulposo (PGNP) como padrão, cuja concentração da solução original foi determinada por eletroforese em gel de agarose e densitometria. Assim, obteve-se que o KS correspondia a 17% do peso total (aggrecan = 2650 kDa; core proteico = 200 kDa; 100 CS = 100 x 20 kDa = 2000 kDa; 30 KS = $30 \times 15 \text{ kDa} = 450 \text{ kDa}$; portanto, KS correspondia a $\sim 17\%$ do peso do PGNP).

Em uma placa de 96 poços⁶ foram aplicadas amostras de líquido sinovial (1µl de líquido sinovial diluído em 50µl de PBS) deixando as posições 1-A e 2-A para o branco, e as posições subsequentes dessas colunas para a curva padrão, também em duplicata, começando com aproximadamente 15 ng de PGNP = 2.55 ng de KS, e fazendo-se diluição sequencial em PBS. Cada poço finalizou com volume de 50 µl. A placa foi mantida sob agitação constante durante 60 minutos em temperatura ambiente (RT), e lavada em seguida três vezes com PBS. Na sequência, os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com 200 µl de solução de soroalbumina bovina (BSA) 1% em PBS, e a placa foi incubada e mantida novamente sob agitação constante por 60 minutos RT. Após uma lavagem da placa com PBS, foram adicionados 50 µl de anticorpo primário diluído 1:3.000 em solução em BSA 1% em PBS e a placa mantida sob agitação constante durante 60 minutos RT. A placa foi lavada três vezes com PBS e em seguida foram adicionados 50 µl de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo complexado com biotina (diluído 1:2000 em BSA 1% em PBS) e a placa foi mantida sob agitação constante em temperatura ambiente durante 60 minutos. A placa foi lavada três vezes com PBS e em seguida foi incubada com 50 µl do complexo estreptavidina-peroxidase diluído 1:2000 em BSA 1% em PBS sob agitação constante e protegida da luz durante 30 minutos. Após cinco lavagens com PBS, a placa continuou protegida da luz e recebeu 50 µl de substrato recém-preparado (reagentes A+B) durante 15 minutos RT. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 1M, e a absorbância da amostra foi lida à 450 nm em leitor de microplaca.

5.4.5 Quantificação do AH e CS

Para a determinação de do AH e CS no LS foram utilizadas as amostras acondicionadas em tubos tipo eppendorf sem anticoagulante a -80°C.

⁵²

⁶ Greiner Bio-one

Cinquenta microlitros de cada amostra foram adicionados a 100 μ l de protease alcalina P126 maxatase (4 mg/ml Tris HCl 0,05 M) e incubados em banho-maria a 50°C, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram fervidas durante 15 minutos e centrifugadas⁷ em temperatura ambiente a 3000 x g por 15 minutos para a remoção de resíduos insolúveis. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 600 μ l e seco em vácuo⁸ por pelo menos 2 horas a 45°C. As amostras foram ressuspendidas em 25 μ l de água destilada.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, em tampão 1,3diaminopropano-acetato 0,05 M e pH 9 (PDA), em cuba refrigerada, por aproximadamente uma hora, como descrito por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976). Foram utilizados 5 µl de um padrão de CS e um padrão de AH, ambos na concentração de 1 mg/ml. O corante vermelho de cresol foi adicionado como indicador da distância percorrida. Após a eletroforese os GAGs foram fixados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1% pelo tempo mínimo de duas horas. Em seguida o gel foi coberto com papel filtro e seco sob corrente de ar aquecida. O CS foi corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1% em etanol 50% por 15 minutos. O excesso de corante foi removido pela solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Ato contínuo o AH foi corado com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M pH 5 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M.

As lâminas foram escaneadas⁹ e as imagens editadas¹⁰ para análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas¹¹.

5.4.6 Determinação do peso molecular AH

Para a determinação do peso molecular do AH foram utilizadas as amostras acondicionadas em tubos secos a -80°C.

Cinquenta microlitros de cada amostra de LS foram adicionados a 100 μ l de protease alcalina P126 maxatase (4mg/ml Tris HCl 0,05M pH 8,0) e incubados em banho-maria a 50°C, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram fervidas durante 15 minutos e centrifugadas em temperatura ambiente a 3000 x g por 15 minutos para a remoção de resíduos insolúveis. O

⁷ Centrífuga 5418 - Eppendorf

⁸ Vacufuge vaccum concentrator - Eppendorf®

⁹ Epson Expression 1680®

¹⁰ Laund Silver Fast Epson IT8®

¹¹ Lauch VisionWorksLS®

sobrenadante foi transferido para um tubo de 600 μ l e seco em vácuo por pelo menos 2 horas a 45°C. As amostras foram ressuspendidas em 25 μ l de água destilada.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %, em tampão Trisacetato-EDTA 1 x 0,04M, pH 8 (acetato 0,02M, EDTA 0,01M), em cuba refrigerada, por aproximadamente 40 minutos, como descrito por Cowman et al. (2011). Foram utilizados 5µl de dois padrões de AH de pesos moleculares conhecidos em todas as lâminas, sendo o padrão de alto peso de crista de galo 2 mg/ml (800 kDa) e o padrão de baixo peso de traqueia bovina 1 mg/ml (20kDa). O corante azul de bromofenol foi adicionado como indicador da distância percorrida. Após a eletroforese, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M pH 5 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M.

Os géis foram escaneados e as imagens editadas para análise das bandas metacromáticas e obtenção das distâncias de migração, sendo a migração inversamente proporcional ao logaritmo do peso molecular do AH. Em seguida confeccionou-se o gráfico no qual o peso molecular é expresso em equação logarítmica e a distância de migração em milímetros.

5.5 ANALISE ESTATÍSTICA

Após o registro em planilhas¹² os dados foram analisados com os softwares estatísticos SPSS 19.0¹³ e R 3.4.2¹⁴.

Análises descritivas foram apresentadas pela mediana e intervalo interquartil (IIQ). Para análise de sensibilidade e especificidade dos diferentes marcadores foram construídas curvas ROC para cada um deles em relação a cada doença. Para a comparação entre grupos (Controle, Fraturas, OA1, OA2, OA3 e OC) foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis, sendo aplicado o teste de Mann Whitney para análise post-hoc.

Em todas as análises o nível de significância (α) utilizado foi de 5%. Isso implica que para as análises com múltiplas comparações bivariadas (post-hoc), foi aceito para cada uma das comparações um valor de $\alpha = 0.05 / m$, onde *m* é o número de comparações.

¹² Microsoft Excel® 2010

¹³ IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.

¹⁴ R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

6 RESULTADOS

6.1 ANIMAIS

No grupo Fratura todos os animais eram da raça Quarto de Milha, com idade média de três anos. Dos 22 animais, 12 eram machos (55%). Entre as 45 articulações estudadas, 22 eram intercárpicas (49%), 21 radiocárpicas (47%) e apenas uma articulação carpometacarpica (2%). A articulação do animal 12 não foi especificada, sendo classificada genericamente como articulação cárpica (2%). Em seis animais (27%) apenas uma articulação foi acometida; 12 animais (55%) tiveram duas articulações acometidas, um animal (5%) apresentou três articulações acometidas e em três animais (14%) houve acometimento de quatro articulações.

No grupo OA1, quatro animais eram da raça Mangalarga (24%), dois da raça Brasileiro de Hipismo (12%), dois da raça Quarto de Milha (12%), dois da raça American Trotter (12%), um da raça Sela Belga (5%), um da raça Puro Sangue Lusitano (5%) e um da raça Puro Sangue Arabe (5%). Um caso (5%) ocorreu na espécie muar. Em três animais (20%) a raça não foi determinada. A idade média do grupo OA1 foi de oito anos, e dos 17 animais, 11 foram fêmeas (65%). Entre as 17 articulações estudadas, nove foram MCF (53%), quatro TT (24%), uma FTP (6%), uma interfalangeana proximal (6%), uma radiocárpica (6%) e uma EU (6%).

No grupo OA2, três animais eram da raça Brasileiro de Hipismo (23%), dois da raça Quarto de Milha (15%), um da raça Sela Belga (8%), um da raça Apaloosa (8%), um da raça American Trotter (8%), um da raça Puro Sangue Lusitano (8%) e um animal Sem Raça Definida (8%). Em três animais (23%) a raça não foi determinada. A idade média do grupo OA2 foi de nove anos, e dos 13 animais, 10 eram machos (77%). Das 13 articulações estudadas, seis foram MCF (46%), quatro metatarsofalangeanas (31%), duas TT (15%) e uma radiocárpica (8%).

No grupo OA3, dois animais eram da raça Quarto de Milha (20%), dois da raça Mangalarga (20%), um da raça Sela Belga (10%), um da raça Puro Sangue Inglês (10%), um da raça American Trotter (10%), um da raça Puro Sangue Árabe (10%) e um Sem Raça Definida (10%). Em um animal (10%) a raça não foi estabelecida. A idade média do grupo OA3 foi de sete anos, e dos 10 animais, oito eram femeas (77%). Das 11 articulações estudadas, cinco foram MCF (45%), duas TT (18%), duas interfalangeanas (18%), uma radiocárpica (9%) e uma EU (9%).

No grupo OC, 26 animais eram da raça Brasileiro de Hipismo (47%), 10 da raça Puro Sangue Lusitano (18%), quatro da raça Mangalarga (7%), quatro da raça American Trotter (7%), quatro da raça Quarto de Milha (7%), dois Sem Raça Definida (4%), um da raça Holstein (2%) e um asinino da raça Pêga (2%). Em três animais a raça não foi definida. A idade média do grupo OC foi de três anos, sendo 37 animais machos (67%). Das 80 articulações estudadas, 45 eram TT (56%), 17 metatarsofalangeanas (21%), 10 MCF (13%), quatro FTP (5%), três articulações cárpicas (4%) e uma EU (1%). No animal 46 a articulação não pode ser estabelecida. Em 32 animais (58%) apenas uma articulação foi acometida; 19 animais (35%) tiveram duas articulações acometidas, dois animais (4%) apresentaram três articulações acometidas e em apenas um animal (2%) houve acometimento de quatro articulações.

O grupo controle foi composto por animais da raça Puro Sangue Árabe com idade média de três anos, sendo sua maioria machos (n=14, 88%). Foram coletadas 28 articulações TT (55%) e 23 articulações MCF (45%).

6.2 CLASSIFICAÇÃO DAS OAS

No total foram coletadas 40 articulações com OA. Dezessete articulações (43%) foram classificadas como OA grau leve, 13 articulações (33%) como OA grau moderado e 10 articulações (24%) como OA grau severo. Os parâmetros avaliados, bem como a pontuação atribuída a cada articulação encontram-se descritos nos Quadro 8.

Articulação	Presença de diminuição da interlinha radiográfica	Evidência de osteófito e proliferações ósseas	Evidência de entesófitos	Pontuação final	Classificação
1	1	1	1	3	OA1
2	1	0	0	1	OA1
3	2	1	1	4	OA1
4	1	1	1	3	OA1
5	2	0	0	2	OA1
6	2	1	1	4	OA1
7	1	0	0	1	OA1
8	1	1	1	3	OA1
9	1	0	0	1	OA1
10	2	1	1	4	OA1
11	1	0	0	1	OA1
12	2	0	0	2	OA1

Quadro 8 – Parâmetros da OA avaliados através do exame radiográfico e classificação das OAs baseada nas alterações encontradas – 2018.

(continua)

13	2	1	1	4	OA1
14	1	1	1	3	OA1
15	1	0	0	1	OA1
16	1	1	1	3	OA1
17	2	1	1	4	OA1
1	2	1	2	5	OA2
2	2	2	2	6	OA2
3	2	2	2	6	OA2
4	3	2	3	8	OA2
5	2	1	2	5	OA2
6	3	2	2	7	OA2
7	3	1	2	6	OA2
8	2	1	3	6	OA2
9	2	2	2	6	OA2
10	3	2	2	7	OA2
11	2	2	3	7	OA2
12	3	1	3	7	OA2
13	2	1	2	5	OA2
1	3	3	4	10	OA3
2	2	3	4	9	OA3
3	3	3	4	10	OA3
4	3	4	3	10	OA3
5	3	4	4	11	OA3
6	2	3	4	9	OA3
7	3	4	4	11	OA3
8	3	4	4	11	OA3
9	2	3	4	9	OA3
10	3	3	3	9	OA3

6.3 LÍQUIDO SINOVIAL

Os valores individuais, média e desvio padrão (DP) de todos os biomarcadores analisados em cada grupo (Controle, Fraturas, OA1, OA2, OA3 e OC) encontram-se nos Apêndices A ao. Os valores de p das comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 1.

		Grupos																	
		Control	le		Fratura	IS		OA1			OA2			OA3			OC		
Variável	n	mediana	ΠQ	n	mediana	IIQ	n	mediana	IIQ	n	mediana	IIQ	n	mediana	IIQ	n	mediana	IIQ	p-valor
AH (µg/ml)	44	393,10	140,60	51	404,95	191,01	16	393,50	180,97	16	336,45	339,15	13	370,18	220,72	81	335,45	168,89	0,176
CS (µg/ml)	44	43,63	26,54	51	33,62	25,05	16	34,39	26,40	16	33,59	16,03	13	34,66	46,33	81	39,58	24,49	0,431
KS (ng/ml)	19	248,32 ^{bce}	231,53	24	59,40 ^{af}	52,20	12	75,44 ^{af}	100,19	13	107,09	140,74	8	60,60 ^{af}	46,19	78	151,21 ^{bce}	122,24	0,000
IL1 (pg/ml)	30	3,98 ^{cdf}	1,87	12	5,67	4,19	13	5,94 ª	5,05	14	8,29 ª	7,53	9	6,60	8,65	12	7,53ª	3,08	0,000
IL6 (pg/ml)	30	3,42	1,88	9	4,29	2,87	12	3,77	2,92	14	5,24	3,50	7	8,50	20,56	11	4,32	2,26	0,200
TNF (pg/ml)	30	1,61 ^{bcde}	0,74	13	2,36 ^a	1,01	13	2,53ª	0,87	13	2,53ª	0,41	9	2,53ª	0,76	10	2,36	0,90	0,000
IL10 (pg/ml)	29	70,45	74,74	10	37,03	30,74	13	72,61	70,13	13	46,10	36,19	8	50,92	46,25	9	26,71	74,62	0,110
PGE (pg/ml)	44	28,80 ^{be}	26,17	53	121,72 ^{af}	177,14	15	37,80	37,18	16	43,39	126,01	10	190,19 ^{af}	312,88	38	22,62 ^{be}	32,49	0,000
Contagem celular	45	189,00	179,00	21	110,00	118,00	13	200,00	407,50	10	124,00	186,25	6	375,00	392,25	73	100,00	192,50	0,192
0-500 kDa (%)	49	30,00	27,50	52	22,50	28,25	17	35,00	26,50	12	36,00	39,25	12	29,50	44,50	79	35,00	36,00	0,068
500-1000 kDa (%)	49	-	-	52	0,00	0,00	17	0,00	0,00	12	0,00	26,25	12	0,00	0,00	79	0,00	0,00	0,059
1000-2000 kDa (%)	49	0,00 ^{bcef}	-	52	0,00 ^a	0,00	17	0,00 ^a	45,50	12	0,00	8,25	12	0,00 ^a	51,00	79	0,00 ^a	0,00	0,000
>2000 kDa (%)	49	70,00 ^e	27,50	52	75,00	41,25	17	65,00	80,00	12	51,50	58,75	12	13,50 ^a	69,50	79	56,00	60,00	0,002

Tabela 1 – Valores de p das comparações das medianas e intervalos interquartis entre os grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC. Os valores estatisticamente significativos encontram-se em negrito – São Paulo – 2018.

a = estatisticamente diferente do grupo controle; b = estatisticamente diferente do grupo fraturas; c = estatisticamente diferente do grupo OA1; d = estatisticamente diferente do grupo OA2; e = estatisticamente diferente do grupo AO3; f = estatisticamente diferente do grupo OC

6.3.1 Contagem celular

Não houve diferença estatística significativa na contagem total de células nucleadas entre os grupos doentes em relação ao grupo controle (p>0,05). Também não foram significativas as diferentes contagens entre os grupos doentes (p>0,05). A distribuição dos dados referentes à contagem celular encontra-se no Gráfico 1.

Gráfico 1– Distribuição da contagem total de células nucleadas (células/µl) presentes no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.



6.3.2 Quantificação das citocinas inflamatórias IL-1β, IL-6, e TNFα e antiinflamatória IL-10

As concentrações de IL-1 β foram estatisticamente maiores nos grupos OA1, OA2 e OC em relação ao grupo controle (p<0,05). Não houve diferença significativa quando se comparou os diferentes grupos doentes entre si ((p>0,05).

As concentrações de TNF α foram estatisticamente maiores nos grupos Fraturas, OA1, OA2 e OA3 em relação ao grupo controle (p<0,05). Não houve diferença significativa quando se comparou os diferentes grupos doentes entre si (p).

Não houve diferença estatística significativa nos valores de IL-6 e IL-10 entre os grupos doentes em relação ao grupo controle (p>0,05). Também não foram significativas as diferentes concentrações entre os grupos doentes (p>0,05). A distribuição dos dados referentes à IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF α encontram-se na Figura 1.





6.3.3 Quantificação da PGE2

As concentrações de PGE₂ do grupo controle foram estatisticamente menores em relação aos grupos Fraturas e OA3 (p<0,05). Quando se comparou os diferentes grupos doentes, as concentrações de PGE₂ do grupo OC foram estatisticamente menores em relação ao grupo Fraturas (p-valor <0,001) e ao grupo OA3 (p=0,002). A distribuição dos dados referentes à PGE₂ encontra-se no Gráfico 2.

Gráfico 2– Distribuição da concentração de PGE₂ presente no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.



6.3.4 Quantificação do KS

•

A concentração de KS do grupo controle foi significativamente superior às concentrações dos grupos Fraturas, OA1 e OA3 (p<0,05). Quando se comparou os diferentes grupos doentes, as concentrações do grupo OC foram significativamente inferiores às concentrações dos grupos Fraturas (p<0,001), OA1 (p=0,002) e OA3 (p<0,001). A distribuição dos dados referentes ao KS encontra-se no Gráfico 3

Gráfico 3– Distribuição da concentração de KS presente no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.



6.3.5 Quantificação do AH e CS

A identificação e quantificação do AH e CS do LS de todas as articulações foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,5%, tampão PDA, como descrito em Métodos. A Figura 2 mostra gel representativo.

Figura 2– Eletroforese em gel de agarose 0,5% dos GAGs do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC. CS: CS padrão, 5 μg; AH: AH padrão, 5 μg – São Paulo – 2018.



Não houve diferença estatística significativa nos valores de CS e AH entre os grupos doentes em relação ao grupo controle (p>0,05). Também não foram significativas as diferentes

concentrações entre os grupos doentes (p>0,05). A distribuição dos dados referentes ao CS e AH encontra-se na Figura 3.



Figura 3 – Representação gráfica do tipo Boxplot da distribuição da concentração de CS (A) e AH (B) no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.

6.3.6 Determinação do peso molecular de AH

A determinação do peso molecular do AH do LS de todas as articulações foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, tampão TAE, como descrito em Métodos. As figuras 4 e 5 mostram géis representativos.

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1% da padronização do peso molecular dos ácidos hialurônicos utilizados como padrões em nossas analises. TB: AH de traqueia bovina, 20 kDa, P100: padrão AH polidisperso, 100kDa; M100: padrão AH monodisperso, 100kDa; M150: padrão AH monodisperso, 150 kDa; M200: padrão AH monodisperso, 250 kDa; M601: padrão AH monodisperso, 601 kDa; M2500: padrão AH monodisperso, 2500 kDa; CG1: AH de crista de galo, 1000 kDa (1mg/ml); CG2: AH de crista de galo, 1000 kDa (2mg/ml) - São Paulo - 2018.



P100 M100 M150 M250 M601 M2500 CG1

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose peso molecular do AH do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC. CG: padrão AH de crista de galo, 1000 kDa; TB: padrão AH de traqueia bovina, 20 kDa - São Paulo - 2018.



Não houve diferença estatística no percentual de AH de baixo peso molecular (0 a 1000 kDa) entre os grupos (p>0,05). Já a porcentagem de AH de médio peso molecular (1000-2000 kDa) do grupo controle foi significativamente menor em relação aos grupos Fraturas, OA1, OA3 e OC (p<0,05). A porcentagem de AH de alto peso molecular (>2000 kDa) foi significativamente maior no grupo controle em relação ao grupo OA3 (p<0,05) (Gráfico 4). A distribuição dos dados referentes ao peso molecular do AH encontra-se na Figura 6.



Gráfico 4 – Porcentagem do peso molecular do AH presente no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018

Figura 6 – Distribuição da porcentagem de AH com peso molecular 0-500 kDa (A), 500-1000 kDa (B), 1000-2000 kDa (C) e >2000 kDa (D) no LS coletado das articulações dos grupos Controle, Fratura, OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.



6.3.7 Determinação da sensibilidade e especificidade dos biomarcadores do LS

Foram confeccionadas curvas ROC para analisar a sensibilidade e especificidade de cada biomarcador estudado. As áreas abaixo da curva e o valor de p associado à cada curva encontram-se na Tabela 2.

-	Curva ROC									
	Fraturas		OA1		OA2		OA3		OC	
Variável	p-valor	AUC	p-valor	AUC	p-valor	AUC	p-valor	AUC	p-valor	AUC
AH (ug/ml)	0,633	0,471	0,517	0,841	0,701	0,533	0,909	0,490	0,054	0,605
CS (ug/ml)	0,043	0,379	0,422	0,432	0,367	0,423	0,690	0,463	0,505	0,464
KS (ng/ml)	0,000	0,818	0,004	0,816	0,011	0,769	0,010	0,895	0,066	0,636
IL1 (pg/ml)	0,051	0,694	0,003	0,786	0,000	0,840	0,005	0,811	0,003	0,799
IL6 (pg/ml)	0,286	0,619	0,380	0,587	0,144	0,638	0,022	0,781	0,462	0,576
TNF (pg/ml)	0,000	0,862	0,000	0,847	0,000	0,849	0,000	0,922	0,008	0,782
IL10 (pg/ml)	0,062	0,300	0,786	0,527	0,103	0,341	0,223	0,358	0,264	0,375
PGE (pg/ml)	0,000	0,852	0,223	0,606	0,023	0,693	0,002	0,816	0,486	0,455
Contagem celular	0,060	0,356	0,955	0,505	0,631	0,451	0,313	0,628	0,048	0,391
0-500 kDa (%)	0,030	0,374	0,698	0,532	0,935	0,508	0,574	0,553	0,529	0,533
500-1000 kDa (%)	0,405	0,548	0,719	0,529	0,182	0,625	0,374	0,583	0,401	0,544
1000-2000 kDa (%)	0,134	0,413	0,012	0,294	0,182	0,375	0,026	0,292	0,031	0,386
>2000 kDa (%)	0,676	0,476	0,105	0,633	0,024	0,711	0,001	0,798	0,008	0,640

Tabela 2 – Valor de p e área abaixo da curva ROC (AUC) dos biomarcadores presente no LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC. Os valores estatisticamente significativos encontram-se em negrito – São Paulo – 2018

No grupo Fraturas, a área sob a curva ROC foi de 0,818 para o KS, 0,862 para o TNF α e 0,852 para a PGE₂, conferindo boa sensibilidade e especificidade destes biomarcadores nesta enfermidade.

No grupo OA1, a área sob a curva ROC foi de 0,816 para o KS, 0,786 para a IL-1 β e 0,847 para o TNF α , conferindo boa sensibilidade e especificidade destes biomarcadores nesta enfermidade. No grupo OA2, a área sob a curva ROC foi de 0,769 para o KS, 0,840 para a IL-1 β , 0,849 para o TNF α , 0,693 para a PGE₂ e 0,711 para o AH de alto peso molecular (>2000 kDa), conferindo boa sensibilidade e especificidade destes biomarcadores nesta enfermidade. No grupo OA3, a área sob a curva ROC foi de 0,895 para o KS, 0,811 para a IL-1 β , 0,781 para IL-6, 0,922 para o TNF α , 0,816 para a PGE₂ e 0,798 para o AH de alto peso molecular (>2000 kDa), conferindo boa sensibilidade e especificidade destes biomarcadores nesta enfermidade. No grupo OA3, a área sob a curva ROC foi de 0,895 para o KS, 0,811 para a IL-1 β , 0,781 para IL-6, 0,922 para o TNF α , 0,816 para a PGE₂ e 0,798 para o AH de alto peso molecular (>2000 kDa), conferindo boa sensibilidade e especificidade destes biomarcadores no diagnóstico desta enfermidade. O AH de médio peso (1000-2000 kDa) apresentou significância contraria, com área de 0,292.

No grupo OC, a área sob a curva ROC foi de 0,799 para a IL-1 β , 0,782 para o TNF α e 0,640 para o AH de alto peso molecular, conferindo boa sensibilidade e especificidade destes biomarcadores. O AH de médio peso (1000-2000 kDa) e a contagem celular apresentaram significância contraria, com área de 0,386 e 0,391 respectivamente.

7 DISCUSSÃO

A validação da existência de novos biomarcardores e posterior compreensão de seu comportamento exige disponibilidade de material para pesquisa. De acordo com McIlwraith et al. (2017), o LS de cavalos é fonte potencial de biomarcadores articulares, uma vez que é continuamente renovado e está em contato direto com quase todos os componentes teciduais relevantes (PEFFERS et al., 2015). Além disso, o LS pode ser obtido com relativa facilidade do animal vivo sem provocar destruição tecidual significativa. No presente estudo avaliamos o LS de cavalos diagnosticados com fratura intra-articular, OA e OC, e comparamos com o LS de cavalos hígidos e sem histórico de doenças articulares, com a finalidade de obtermos um painel do comportamento de cada biomarcador dentro destas enfermidades.

A graduação da OA tem sido realizada em alguns trabalhos com a intenção de melhorar a compreensão sobre os estágios iniciais da doença (BERTUGLIA et al., 2016a; BOYCE et al., 2013; MANINCHEDDA et al., 2015; NEUNDORF et al., 2010; SILVA, 2014). Silva (2014) correlacionou informações de anamnese, exame físico, radiográfico, ultrassonográfico e artroscópico de 126 articulações com OA ou OC e criou um escore cujas mais altas pontuações correspondem as mais graves lesões. No presente trabalho, adaptamos o sistema de classificação de Silva (2014), ou seja, foram considerdos essencialmente parâmetros com maior confiabilidade, sendo a diminuição do espaço articular, a presença de osteófitos e a presença de entesófitos (BOYCE et al., 2013; MANINCHEDDA et al., 2015). Assim, após a avaliação radiográfica, os animais foram distribuídos nos grupos OA leve (OA1), moderada (OA2) e severa (OA3).

Foram coletadas ao todo 166 articulações doentes de 113 equídeos. Destes, 67 (59%) eram machos com idade média de cinco anos, corroborando com os estudos de Neundorf et al. (2010), Machado et al. (2012) e Brossi (2014), que observaram prevalência de lesões articulares em machos com quatro anos e meio. Também segundo Reed et al. (2012), lesões articulares de maior gravidade ocorrem nos machos, sugerindo variabilidade biológica entre os sexos no metabolismo cartilagíneo, na maturidade do sistema musculoesquelético e na resposta adaptativa ao exercício (REED et al., 2013). Apesar da predisposição das artropatias pelo sexo masculino estar vinculada aos efeitos hormonais ou a taxa de crescimento sexo-dependente, Stock, Hamann e Distl (2006) não encontraram diferenças entre os sexos na prevalência de doenças articulares ou não conseguiram demonstrar o efeito direto da taxa de crescimento na etiologia das mesmas (YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007).

Pinilla et al. (2017) afirmam que há uma correlação positiva entre idade e as alterações histopatológicas cartilagíneas, endossando a hipótese de que animais mais velhos tendem a apresentar lesões mais graves (NEUNDORF et al., 2010) e maior resposta inflamatória (KAHN et al., 2017). Corroborando com a literatura, em nosso estudo observamos que os animais mais velhos, com idade entre sete e nove anos, eram portadores de OA, enfermidade com maior grau de comprometimento cartilagíneo de acordo com o comportamento observado dos biomarcadores inflamatórios. Por outro lado, tanto a OC quanto as fraturas ocorreram em animais com idade média de três anos, faixa etária correspondente ao início dos treinamentos e competições conforme descrito na literatura (BROSSI, 2014; MACHADO et al., 2012; MIYAKOSHI et al., 2017; SMITH; WRIGHT, 2014).

Diversos estudos relatam a prevalência de lesões nas articulações MCF e MTF (MCCARTY et al., 2015; WRIGHT; MINSHALL, 2014). Nossos resultados corroboram com a literatura, uma vez que observamos predominância da articulação MCF em todos os grupos de OA. Considerando que a força mecânica na superfície articular é importante fator predisponente da OA (FRAZER et al., 2017; MCCARTY et al., 2016), a vulnerabilidade das articulações MCF e MTF é justificada pela sua baixa capacidade de dissipação de energia, uma vez que apresentam alta densidade celular na camada superficial da cartilagem (NOVAKOFSKI et al., 2015). No grupo com OC, por outro lado, houve predomínio das articulações TT e MTF, corroborando com as informações descritas pela literatura para as condições osteocondrais juvenis (BOADO; LOPEZ-SANROMAN, 2016; BROSSI, 2014; DENOIX et al., 2013b; DESJARDIN et al., 2014; OLSTAD; EKMAN; CARLSON, 2015; WRIGHT; MINSHALL, 2014). Existem divergências em relação à prevalência desta artropatia na articulação FTP, pois enquanto alguns autores afirmam a alta frequência de acometimento (HILLA; DISTL, 2013), outros dizem ser um local de rara casuística (BOADO; LOPEZ-SANROMAN, 2016; VAN GREVENHOF et al., 2009). No presente estudo, foram observadas apenas quatro articulações FTP (5%) dentro do grupo OC; de acordo com Van Weeren e Denoix (2013), a herdabilidade para o desenvolvimento da OC nas articulações TT, MCF e MTF é moderada, enquanto aparentemente não existe para a articulação FTP

A contagem leucocitária média no LS é de até 300 células/µl em articulações hídigas em repouso (MOREIRA et al., 2015; NEUENSCHWANDER, 2016; VENDRUSCOLO, 2017) ou submetidas ao exercício (BACCARIN et al., 2014), valor semelhante ao encontrado no presente estudo. Equinos com sinovite induzida experimentalmente apresentaram aumento de células nucleadas no LS poucas horas após o desafio articular com LPS (ANDREASSEN et al., 2017; NEUENSCHWANDER, 2016). Este comportamento leucocitário corresponde à ativação

da hemostasia em resposta ao estimulo inflamatório, uma vez que aumento concomitante das concentrações de fibrinogênio e proteína total também foi observado (ANDREASSEN et al., 2017). O uso de anfotericina B na indução da sinovite é descrito por Barrachina et al. (2016), que observaram aumento da contagem de células nucleadas até 15 dias após estimulo. Alta concentração de leucócitos no LS de animais com artropatias é relatado por alguns autores (BROSSI, 2014; MACHADO et al., 2012). Neste caso, a quebra da molécula de agrecam por ação de mediadores inflamatórios (FRISBIE et al., 2008; HUI et al., 2012; NEUNDORF et al., 2010; PEFFERS; THORNTON; CLEGG, 2016) estimula a resposta inflamatória articular, particularmente a ativação dos macrófagos (DAGHESTANI; PIEPER; KRAUS, 2015; ORLOWSKY; KRAUS, 2015). No estudo realizado por Martins et al (2014), no entanto, mesmo após a criação de um defeito osteocondral não foram observadas diferenças significativas na contagem celular do LS coletado semanalmente. Em nosso trabalho, também, não observamos diferença significativa entre a contagem celular dos grupos doentes em relação ao grupo controle. Este resultado se deve, possivelmente, ao intervalo de tempo entre a coleta do LS e a analise física, uma vez que as amostras permaneceram refrigeradas por até quatro dias, acarretando em perda e destruição celular.

A participação das citocinas inflamatórias na indução e degradação da cartilagem articular é bem estabelecida (WOJDASIEWICZ; PONIATOWSKI; SZUKIEWICZ, 2014; ZAMLI; SHARIF, 2011). O TNF α é a citocina mais proeminente em estágios inflamatórios agudos (SHAH et al., 2017; ZHANG; EGAN; WANG, 2015), visto que é fortemente expressada na membrana sinovial e cartilagem articular (KAMM; NIXON; WITTE, 2010). Bertuglia et al. (2016a) comprovaram o caráter agudo do TNF α ao relatarem maiores concentrações desta citocina em cavalos de corrida com fratura traumática espontânea previamente ao agravamento das alterações radiográficas nestes animais. Neste aspecto, nossos resultados corroboram com a literatura, considerando que os grupos Fraturas, OA1, OA2 e OA3 apresentaram concentrações significativamente maiores de TNF α em relação ao grupo controle. Ainda, a análise da curva ROC revelou que o TNF α é um biomarcador altamente preciso no diagnóstico de fraturas traumáticas e de OA, dada sua boa especificidade e sensibilidade.

Da mesma maneira que o TNF α , altas concentrações de IL-1 β são observadas durante a inflamação articular como resultado do estímulo sobre os sinoviócitos e condrócitos (MCILWRAITH, 2005; SHAH et al., 2017; ZHANG; EGAN; WANG, 2015). Do ponto de vista patológico, as fraturas intra-articulares não possuem caráter inflamatório, uma vez que ocorrem pela fadiga do osso subcondral (HOPPER; SINGER; HENSON, 2018) acompanhada de baixa perfusão sanguínea, caracterizando um processo isquêmico progressivo

(MIYAKOSHI et al., 2017; PINILLA et al., 2017). Assim, nosso resultado corrobora com a literatura, uma vez que as concentrações de IL-1β dos grupos Fraturas e Controle não apresentaram diferença significativa. Por outro lado, a liberação de citocinas inflamatórias na OA, em especial de IL-1 β , decorre principalmente da sinovite e capsulite (CREMA et al., 2017; MCILWRAITH, 2017; TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017; WANG et al., 2017), fato evidenciado em nosso estudo, visto que altas concentrações de IL-1 β foram observadas nos grupos OA1 e OA2. Curiosamente, a concentração desta citocina no grupo OA3 não diferiu estatisticamente do grupo controle; considerando o estágio avançado da doença e o intenso comprometimento cartilagíneo neste grupo, podemos sugerir o baixo potencial de reparo da cartilagem. Já na OC, apesar dos produtos do turnover do colágeno e agrecam serem os biomarcadores sinoviais mais associados com esta enfermidade (DE GRAUW et al., 2011; LAVERTY et al., 2002; MACHADO et al., 2012), a analise proteômica do LS destes animais revelou o envolvimento das vias da inflamação, coagulação, estresse oxidativo e danos da matriz, semelhantemente ao encontrado na OA (CHIARADIA et al., 2012). Assim, nossos resultados corroboram com Chiaradia et al (2012), visto que altas concentrações de IL-1ß foram detectadas no grupo OC. Ainda, a análise da curva ROC acusou boa sensibilidade e especificidade da IL-1β para os grupos OA1, OA2, OA3 e OC, atribuindo alta importância a esta citocina na fisiopatologia destas enfermidades.

Hyldahl et al. (2016) observaram aumento da concentração sérica de IL-6 em cavalos hígidos após atividade física controlada; no entanto, o mesmo não foi acompanhado por maiores concentrações no LS, indicando que a articulação não é uma fonte significativa da IL-6 circulante. Maiores concentrações de IL-1 β e IL-6 foram detectadas no LS de cavalos de corrida com OA (BERTUGLIA et al., 2016a). Ainda, um estudo *in vivo* realizado em cavalos de corrida com lesões cárpicas identificou maiores concentrações de IL-6 associadas a presença de fragmentação osteocondral (LEY et al., 2007). Recentemente um estudo *in vitro* observou que o aumento na concentração de IL-6 ocorreu três dias após estimulo com IL-1 β (SVALA et al., 2015), endossando estudos anteriores que relataram aumento na expressão gênica de IL-6 por condrócitos estimulados com IL-1 β (DAVID et al., 2007). Desta maneira, nossos resultados corroboram com a literatura, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos doentes e o grupo controle, mesmo com as altas concentrações de IL-1 β nos grupos OA1, OA2 e OC. Fortalecendo a nossa hipótese, a sensibilidade e especificidade da IL-6 foram evidentes apenas para o grupo OA3, estágio avançado da OA.

A IL-10 é amplamente conhecida pelas suas propriedades anti-inflamatórias, e sua capacidade de inibição de citocinas pró-inflamatórias nas doenças articulares humanas confere

seu potencial condroprotetor (WOJDASIEWICZ; PONIATOWSKI; SZUKIEWICZ, 2014). Embora Hyldahl et al. (2016) não tenham conseguido comprovar a influência da atividade física sobre as concentrações sinoviais de IL-10, Helmark et al. (2010) comprovaram que o exercício aumenta as concentrações desta citocina no LS de pacientes com OA. Por outro lado, Agreste (em dados não publicados) observou menor expressão gênica e menor concentração de IL-10 nas articulações com OA, ao mesmo tempo em que altas concentrações de IL-1β e IL-6 foram detectadas. Em nosso estudo a IL-10 não apresentou bom valor preditivo para as enfermidades estudadas, uma vez que não conseguimos demonstrar alterações significativas nas concentrações entre os diferentes grupos doentes em relação ao grupo controle.

Fisiologicamente, a concentração de PGE2 no LS é influenciada pela idade, sendo que animais jovens tendem a apresentar menores concentrações quando comparados a animais adultos (BACCARIN et al., 2014; KAHN et al., 2017). Aumento nas concentrações de PGE2 do LS tem sido demonstrado em vários modelos experimentais em resposta ao exercício (BACCARIN et al., 2014), à repetição da artrocentese em até 48 horas (FRISBIE et al., 2008; MOREIRA et al., 2015), à fragmentação osteocondral (FRISBIE et al., 2008; LAMPRECHT; WILLIAMS, 2012; MCILWRAITH; FRISBIE; KAWCAK, 2012b) e ao desafio com LPS (KAHN et al., 2017; LUCIA et al., 2013; NEUENSCHWANDER, 2016). Segundo Cunha et al. (2017), nas doenças articulares de caráter inflamatório a produção de PGE₂ pelos condrócitos é estimulada pela IL-1β. Neste contexto nossos resultados corroboram com os de Cunha et al. (2017), e podemos sugerir que as altas concentrações de PGE₂ encontradas no grupo OA3 podem ter sido estimuladas pela IL-1β, observada nos estágios mais iniciais da AO, nos grupos OA1 e OA2. Também o grupo com fraturas intra-articulares apresentou maiores concentrações de PGE₂. Considerada um dos principais mediadores da dor, a PGE₂ é responsavel pela sensibilização das terminações nervosas e desmineralização óssea (MCILWRAITH et al., 2016; PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006), favorecendo a fadiga do osso subcondral que ocorre nas fraturas (HOPPER; SINGER; HENSON, 2018). A análise da curva ROC demonstrou que a concentração de PGE2 é altamente precisa para caracterização de fraturas articulares e OA severa.

A deterioração macroscópica da cartilagem articular é correlacionada positivamente com sua baixa concentração de GAGs (NEUNDORF et al., 2010). Assim como ocorreu em nosso estudo, Frisbie et al. (1999) não encontraram diferença significativa entre as concentrações de KS no LS de equinos saudáveis com portadores de OC. Por outro lado, Misumi et al. (2002) e Todhunter et al. (1997) demonstraram que cavalos com OA apresentam menores concentrações sinoviais de KS quando comparados aos saudáveis. Em cães, foi
demonstrada a diminuição das concentrações de KS no LS após dois a três meses da indução da OA (BUDSBERG; LENZ; THONAR, 2006). Em humanos, a quantificação de KS no LS por HPLC detectou a diminuição das concentrações no pós-operatório de pacientes com OA (NAKAJIMA et al., 2013). Em nosso trabalho, os grupos Fraturas, OA1 e OA3 apresentaram concentrações sinoviais de KS inferiores ao grupo controle e ao grupo OC, sugerindo a supressão do metabolismo cartilagíneo e de seu pequeno potencial de reparo frente à fadiga do osso subcondral e à inflamação. Ainda, a boa sensibilidade e especificidade do KS para os grupos Fraturas, OA1, OA2 e OA3 demonstra ser este um biomarcador altamente preciso para estas enfermidades articulares.

Segundo Svala et al. (2015), o estimulo inflamatório da IL-1 β promove a perda dos GAGs cartilagíneos para o meio articular, e neste contexto nossos resultados destoam da literatura, uma vez que as altas concentrações de IL-1 β observadas nos grupos OA1, OA2 e OC não foram acompanhadas por alterações na concentração dos GAGs. A comparação entre os grupos doentes com o grupo controle não revelou diferença significativa na concentração de GAGs sinoviais, à semelhança do estudo de Skiöldebrand et al. (2005), que não encontraram diferenças entre as concentrações de agrecam do LS de cavalos hígidos e com OA ou OCD.

A concentração média de CS no LS de cavalos sem doença articular é de 40 μ g/ml (BROWN et al., 2007; MOREIRA et al., 2015; NEUENSCHWANDER, 2016; VENDRUSCOLO, 2017). Baccarin et al. (2014) e Martins et al. (2014), no entanto, relatam concentrações médias de 25 μ g/ml para articulações hígidas. Aparentemente, a atividade física exerce efeito positivo sobre o CS, elevando as concentrações sinoviais de animais submetidos ao treinamento (BACCARIN et al., 2014; BROWN et al., 2007; LAMPRECHT; WILLIAMS, 2012). Contrariando os resultados prévios, as concentrações de CS nas enfermidades articulares aqui estudadas não diferiram estatisticamente dos animais saudáveis.

Algumas teorias defendem a ideia de que as alterações metabólicas decorrentes da inflamação são capazes de reduzir a síntese do agrecam (LITTLE et al., 1997; SKIÖLDEBRAND et al., 2001), no entanto, aumento da concentração de CS foi descrito após indução experimental da sinovite e OA (MARTINS et al., 2014; MCILWRAITH; FRISBIE; KAWCAK, 2012; NEUENSCHWANDER, 2016) e repetidas artrocenteses (LAMPRECHT; WILLIAMS, 2012; MOREIRA et al., 2015). Ainda, Baccarin et al. (2014) correlacionou positivamente as altas concentrações sinoviais de CS em cavalos de polo com o desenvolvimento posterior de OA por estes animais, e Sobal et al. (2016) detectaram maiores concentrações de CS nas articulações de cães com OA em estágio inicial, demonstrando o potencial biomarcador deste GAG frente a agressão cartilagínea. Em nosso estudo, entretanto,

nenhum grupo de OA apresentou aumento da concentração de CS, embora baixas concentrações de KS tenham sido identificadas nos grupos doentes. Também Nakajima et al. (2013) não conseguiram demonstrar diferenças significativas entre as concentrações pré e pósoperatórias de CS de pacientes com OA submetidos à artroscopia, mas observaram baixas concentrações de KS no pós-operatório destes pacientes. Este resultado, todavia, é contraditório, uma vez tanto o CS quanto o KS são componentes do agrecam.

A concentração de CS das articulações com OC também não diferiu estatisticamente das articulações normais. Coelho (2009) e Machado et al. (2012) relataram maiores concentrações sinoviais de CS, juntamente com maior a excreção de GAGs urinários, caracterizando a inflamação e destruição da cartilagem articular. Nossos resultados, no entanto, corroboram com a teoria do *turnover* reduzido dos proteoglicanos (LAVERTY; GIRARD, 2013) e da baixa degradação cartilagínea nesta enfermidade (BROSSI, 2014; LAVERTY et al., 2002). Embora Garvican et al. (2008) tenham observado menor síntese de proteoglicanos pelos condrócitos na OCD, a expressão do agrecam não apresentou diferença entre as cartilagens saudáveis e doentes (SEMEVOLOS et al., 2001; MIRAMS et al., 2009).

Em articulações normais a concentração média de AH é de 400 µg/ml (BACCARIN et al., 2014; MARTINS et al., 2014; MOREIRA et al., 2015; NEUENSCHWANDER, 2016; VENDRUSCOLO, 2017), valor semelhante ao encontrado neste estudo. Apesar de alguns trabalhos demonstrarem que a atividade física não exerce efeito sobre estas concentrações (BROWN et al., 2007), aumento significativo em cavalos de polo durante a época competitiva foi observado em animais jovens em início da carreira, mas o mesmo não ocorreu em pôneis mais velhos (BACCARIN et al., 2014), sugerindo um efeito adaptativo relacionado a idade e ao exercício.

Patologicamente, a concentração sinovial do AH pode ser alterada por trauma e/ou inflamação (AVENOSO et al., 2018), mas não pela repetição da artrocentese (MORAES et al., 2015; MOREIRA et al., 2015). Brown et al. (2007) reportaram menores concentrações de AH sinoviais em cavalos com fratura de carpo. A criação de um defeito osteocondral por Martins et al. (2014), bem como a sinovite induzida por Neuenschwander (2016) também provocaram diminuição das concentrações de AH. Em cães, as concentrações de AH sinovial diminuíram após dois meses e meio da indução experimental da OA (BUDSBERG; LENZ; THONAR, 2006). Também em humanos com OA e artrite reumatoide, a concentraçõe o peso molecular do AH foram inferiores ao grupo controle (TAKAHASHI et al., 2004). Ao estudar articulações com OCD, Machado et al. (2012) não observaram diferença significativa entre o grupo controle e os animais doentes, no entanto, os valores médios encontrados pelos autores (800 µg/ml)

foram superiores às concentrações consideradas normais para a espécie. Embora as concentrações encontradas no presente trabalho tenham sido inferiores às observadas por Machado et al. (2012), também não detectamos diferença significativa entre os diferentes grupos doentes e o grupo controle.

O tamanho da molécula de AH é um determinante importante da resposta celular. Cientes das informações de estudos prévios (LEE; COWMAN, 1994; COWMAN et al., 2011), consideramos usar o gel de agarose na concentração de 1% na realização de nosso trabalho. Sob condições normais, a molécula de AH é sintetizada predominantemente como um polímero de alto peso molecular; no entanto, algumas doenças são capazes de gerar fragmentos de menor peso por ação de enzimas e citocinas (HUI et al., 2012). Machado et al. (2012) sugeriram a quebra da molécula de AH em cavalos com OC pela diminuição da viscosidade do LS, uma vez que não detectaram alterações nas concentrações sinoviais deste biomarcador. Brown et al. (2007) observaram que cavalos em treinamento ou com fratura de carpo apresentam moléculas menores de AH quando comparados com o grupo em descanso, evidenciando o efeito do exercício e da lesão sobre o peso molecular é associada com a progressão da OA (WEI et al., 2010; BAND et al., 2015), e isso fica claro em nosso trabalho, uma vez que apenas o grupo OA3 apresentou percentual significativamente menor de AH de alto peso em relação ao grupo controle, evidenciando a quebra da molécula diretamente proporcional a gravidade da doença.

O efeito inflamatório dos pequenos fragmentos de AH (<300kDa) foi demonstrado por Stabler et al. (2017), que observaram a correlação diretamente proporcional entre a maior concentração de AH de baixo peso molecular e a maior liberação de IL-1 β . À semelhança do que se observou em nosso estudo, podemos sugerir que a maior quebra de AH que ocorre na OA3 seja consequência do estimulo inflamatório prévio de liberação de IL-1 β nos estágios iniciais da doença, conforme constatado pelos grupos OA1 e OA2. Ainda, comprovando os efeitos inflamatórios das moléculas de baixo peso e corroborando com o fato de que no grupo OA3 as altas concentrações de PGE₂ ocorreram concomitantemente ao menor percentual de AH de alto peso, Hashizume et al. (2010) comprovaram que a modulação de PGE₂ e da atividade das MMPs só ocorre na presença de moléculas de AH de alto peso.

8 CONCLUSÃO

Fraturas intra-articulares provocam diminuição das concentrações de KS e aumento das concentrações de TNFα, PGE₂ e AH com peso molecular de 1000-2000 kDa no LS de equinos.

Estágios iniciais da OA induzem a diminuição das concentrações de KS e aumento das concentrações de IL-1 β , TNF α e AH com peso molecular de 1000-2000 kDa no LS de equinos. OAs de grau moderado induzem aumento das concentrações sinoviais de IL-1 β e TNF α . Em estágios de maior severidade, a OA induz a diminuição das concentrações de KS e o percentual de AH de alto peso molecular, ao mesmo tempo em que provoca aumento das concentrações de TNF α , PGE₂ e AH com peso molecular de 1000-2000 kDa.

Na OC ocorre apenas aumento das concentrações sinoviais de IL-1 β e de AH com peso molecular de 1000-2000 kDa.

As concentrações de KS, TNF α e PGE₂ são de alta sensibilidade e especificidade para fraturas intra-articulares e OA grau leve. Já para OC os melhores biomarcadores são a concentração de TNF α e o percentual de AH de alto peso molecular.

Pode-se concluir que baixa concentração de KS e quebra da molécula de AH ocorrem em doenças articulares com maior comprometimento cartilagíneo

9 REFERÊNCIAS

ALLEN, S.E. et al. Description of veterinary events and risk factors for fatality in National Hunt flat racing Thoroughbreds in Great Britain (2000-2013). **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 49, n. 6, p. 700-705, 2017.

ANDO, A. et al. Intra-articular injection of hyaluronan diminishes loss of chondROCytes in a rat immobilized-knee model. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, Sendai, v. 215, n. 4, p. 321-331, 2008.

ANDREASSEN, S.M. et al. Changes in concentrations of haemostatic and inflammatory biomarkers in synovial fluid after intra-articular injection of lipopolysaccharide in horses. **BMC** Veterinary Research, Londres, v. 13, n. 1, p. 182, 2017.

APPLETON, C.T. Osteoarthritis year in review 2017: biology. Osteoarthritis Cartilage, Londres, v. 26, n. 3, p. 296-303, 2017.

AULIN, C. et al. An in vivo cross-linkable hyaluronan gel with inherent anti-inflammatory properties reduces OA cartilage destruction in female mice subjected to cruciate ligament transection. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 25, n. 1, p. 157-165, 2017.

AVENOSO, A. et al. Hyaluronan in experimental injured/inflamed cartilage: In vivo studies. Life Sciences, Oxford, v. 193, p. 132-140, 2018.

BACCARIN, R.Y. et al. Urinary glycosaminoglycans in horse osteoarthritis. Effects of chondroitin sulfate and glucosamine. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 93, n. 1, p. 88-96, 2012.

BACCARIN, R.Y. et al. Relevance of synovial fluid chondroitin sulphate as a biomarker to monitor polo pony joints. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 78, n. 1, p. 50-60, 2014.

BALDUINI, C. et al. Effect of oxygen tension and lactate concentration on keratan sulphate and chondroitin sulphate biosynthesis in bovine cornea. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1115, n. 3, p. 187-191, 1992.

BAND, P.A. et al. Hyaluronan molecular weight distribution is associated with the risk of knee osteoarthritis progression. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 23, n. 1, p. 70-76.

BAO, J.P.; CHEN, W.P.; WU, L.D. Lubricin: a novel potential biotherapeutic approaches for the treatment of osteoarthritis. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 38, n. 5, p.2879-2885, 2011.

BARRACHINA, L. et al. Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 182, p. 74-78, 2016.

BARRY, F.P. et al. Length variation in the keratan sulfate domain of mammalian aggrecan. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 14, n. 4, p. 323-328, 1994.

BASTOW, E.R. et al. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. Cellular and Molecular Life Sciences, Boston, v. 65, n. 3, p. 395-413, 2008.

BAUER, C. et al. Hyaluronan thiomer gel/matrix mediated healing of articular cartilage defects in New Zealand White rabbits-a pilot study. **Journal of Experimental Orthopaedics**, Heidelberg, v. 4, n. 1, p. 14, 2017.

BAYLISS, M.T. et al. Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 22, p. 15892-15900, 1999.

BERTUGLIA, A. et al. Pro-inflammatory cytokines and structural biomarkers are effective to categorize osteoarthritis phenotype and progression in Standardbred racehorses over five years of racing career. **BMC Veterinary Research**, Londres, v. 12, n. 1, p. 246, 2016a.

BERTULGIA, A. et al. Osteoclasts are recruited to the subchondral bone in naturally occurring post-traumatic equine carpal osteoarthritis and may contribute to cartilage degradation. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 24, n. 3, p. 555-566, 2016b.

BHILOCHA, S. et al. Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis methods for molecular mass analysis of 5- to 500-kDa hyaluronan. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 417, n. 1, p. 41-49, 2011.

BHOSALE, A.M.; RICHARDSON, J.B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. **British Medical Bulletin**, Londres, v.87, p. 77-95, 2008.

BILLINGHURST, R.C. et al. Evaluation of serum concentrations of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 65, n. 2, p. 143-150, 2004.

BLEWIS, M.E. et al. Interactive cytokine regulation of synoviocyte lubricant secretion. **Tissue Engineering**, New ROChelle, v. 16, n. 4, p. 1329-1337, 2010.

BLOTT, S.C. et al. A genome-wide association study demonstrates significant genetic variation for fracture risk in Thoroughbred racehorses. **BMC Genomics**, Londres, v. 15, p. 147, 2014.

BLUMER, M.J. et al. The role of cartilage canals in endochondral and perichondral bone formation: are there similarities between these two pROCesses? **Journal of Anatomy**, Londres, v. 206, n. 4, p. 359-372, 2005.

BOADO, A.; LOPEZ-SANROMAN, F.J. Prevalence and characteristics of osteochondrosis in 309 Spanish Purebred horses. **Veterinary Journal**, Londres, v. 207, p. 112-117, 2016.

BOYCE, M.K. et al. Non-terminal animal model of post-traumatic osteoarthritis induced by acute joint injury. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 21, n. 5, p. 746-755, 2013.

BRANDT, K.D.; DIEPPE, P.; RADIN, E.L. Etiopathogenesis of osteoarthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 34, n. 3, p. 531-559, 2008.

BROPHY, R.H. et al. Molecular analysis of age and sex-related gene expression in meniscal tears with and without a concomitant anterior cruciate ligament tear. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 94, n. 5, p. 385-393, 2012.

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

BROWN, M.P. et al. Changes in sulfation patterns of chondroitin sulfate in equine articular cartilage and synovial fluid in response to aging and osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 59, n. 6, p. 786-791, 1998.

BROWN, M.P. et al. Exercise and injury increase chondroitin sulfate chain length and decrease hyaluronan chain length in synovial fluid. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 15, n. 11, p. 1318-1325, 2007.

BRUYERE, O. et al. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Nova Iorque, v. 45, p. S12-S17, 2016. Supplement 4.

BUDSBERG, S.C.; LENZ, M.E.; THONAR, E.J. Serum and synovial fluid concentrations of keratan sulfate and hyaluronan in dogs with induced stifle joint osteoarthritis following cranial cruciate ligament transection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 3, p. 429-432.

BURG, M.A.; COLE, G.J. Claustrin, an antiadhesive neural keratan sulfate proteoglycan, is structurally related to MAP1B. **Journal of Neurobiology**, Nova Iorqye, v. 25, n. 1, p. 1-22, 1994.

CALAMIA, V. et al. Secretome analysis of chondroitin sulfate-treated chondROCytes reveals anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-catabolic properties. Arthritis Research and Therapy, Londres, v. 14, n. 5, p. R202, 2012.

CALLENDER, G.R.; KELSER, R.A. Degenerative arthritis: A comparison of the pathological changes in man and equines. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 14, n. 3, p. 253-272, 1938.

CAMPO, G.M. et al. NF-kB and caspases are involved in the hyaluronan and chondroitin-4sulphate-exerted antioxidant effect in fibroblast cultures exposed to oxidative stress. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, v. 28, n. 4, p. 509-517, 2008.

CAMPO, G.M. et al. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondROCytes. Journal of Cellular Biochemistry, Nova Iorque, v. 106, n. 1, p. 83-92, 2009a.

CAMPO, G.M. et al. Differential effect of molecular size HA in mouse chondROCytes stimulated with PMA. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1790, n. 10, p. 1353-1367, 2009b.

CAMPO, G.M. et al. Differential effect of molecular mass hyaluronan on lipopolysaccharideinduced damage in chondROCytes. **Innate Immunity**, Los Angeles, v. 16, n. 1, p. 48-63, 2010a.

CAMPO, G.M. et al. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondROCytes. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 80, n. 4, p. 480-490, 2010b.

CAMPO, G.M. et al. Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondROCytes. **Biochimie**, Paris, v. 92, v. 2, p. 204-215, 2010c.

CAMPO, G.M. et al. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1812, n. 9, p. 1170-1181, 2011.

CAMPO, G.M. et al. Hyaluronan differently modulates TLR-4 and the inflammatory response in mouse chondROCytes. **Biofactors**, Amsterdam, v. 38, n. 61, p. 69-76, 2012.

CAMPO, G.M. et al. 4-mer hyaluronan oligosaccharides stimulate inflammation response in synovial fibroblasts in part via TAK-1 and in part via p38-MAPK. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 20, n. 9, p. 1162-1172, 2013.

CAMPO, G.M. et al. Inhibition of small HA fragment activity and stimulation of A2A adenosine receptor pathway limit apoptosis and reduce cartilage damage in experimental arthritis. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 143, n. 5, p. 531-543, 2015.

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

CATERSON, B.; MELROSE, J. Keratan Sulphate, a complex Glycosaminoglycan with Unique Functional Capability. **Glycobiology**, Oxford, 2018.

CHAGIN, A.S.; KRONENBERG, H.M. Role of G-proteins in the differentiation of epiphyseal chondROCytes. **Journal of molecular endocrinology**, Bristol, v. 53, n. 2, p. R39-R45, 2014.

CHEN, S.; BIRK, D.E. The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. **Federation of European Biochemical Societies Jornal**, Oxford, v. 280, n. 10, 0. 2120-2137, 2013.

CHEN, S. et al. Interclass small leucine-rich repeat proteoglycan interactions regulate collagen fibrillogenesis and corneal stromal assembly. **Matrix Biology**, Amsterdam, v. 35, p. 103-111, 2014.

CHIARADIA, E. et al. Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 14, p. 4478-4493, 2012.

CHU, C.R.; ANDRIACCHI, T.P. Dance between biology, mechanics, and structure: A systems-based approach to developing osteoarthritis prevention strategies. Journal of Orthopaedic Research, Nova Iorque, v. 33, n. 7, p. 939-947, 2015.

COELHO, J.M. Efeitos da administração oral de glucosamina e condroitim sulfato associados ao acido hialurônico em cavalos com osteoartrite. 2009. 121 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, São Paulo, 2009.

CONRAD, A.H. et al. Proteomic analysis of potential keratan sulfate, chondroitin sulfate A, and hyaluronic acid molecular interactions. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 51, n. 9, p. 4500-4515, 2010.

COOPER, S. et al. Biochemical properties of a keratan sulphate/chondroitin sulphate proteoglycan expressed in primate pluripotent stem cells. **Journal of Anatomy**, Londres, v. 200, p. 259-265, 2002. Parte 3.

COWMAN, M.K. et al. Improved agarose gel electrophoresis method and molecular mass calculation for high molecular mass hyaluronan. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 417, n. 1, p. 50-56, 2011.

COWMAN, M.K. et al. The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 6, p. 261, 2015.

COWMAN, M.K.; MATSUOKA, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, n. 5, p.791-809, 2005.

CREMA, M.D.; et al. Comparison between semiquantitative and quantitative methods for the assessment of knee synovitis in osteoarthritis using non-enhanced and gadolinium-enhanced MRI. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 25, n. 2, p. 267-271, 2017.

CUNHA, A.L. et al. Do chondroitin sulfates with different structures have different activities on chondROCytes and macrophages? **International journal of biological macromolecules**. Guildford, v. 103, p. 1019-1031, 2017.

DAVID, F. et al. Cytokine and chemokine gene expression of IL-1beta stimulated equine articular chondrocytes. **Veterinary Surgery**, v. 36, n. 3, p. 221-227, 2007.

DAGHESTANI, H.N.; PIEPER, C.F.; KRAUS, V.B. Soluble macrophage biomarkers indicate inflammatory phenotypes in patients with knee osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatology**, Malden, v. 67, n. 4, p. 956-965, 2015.

DE GRAUW, J.C. Molecular monitoring of equine joint homeostasis. **The Veterinary** quarterly, Boston, v. 31, n. 2, p. 77-86, 2011.

DE LASALLE, J. et al. Comparisons among radiography, ultrasonography and computed tomography for ex vivo characterization of stifle osteoarthritis in the horse. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, Raleigh, v. 57, n. 5, p. 489-501, 2016.

DEJICA, V.M. et al. Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage. Arthritis Research and Therapy, Londres, v. 14, n. 3, p. R113, 2012.

DELAY, J. Postmortem findings in Ontario racehorses, 2003-2015. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Columbia, v. 29, n. 4, p. 457-464, 2017.

DELLETT, M. et al. Small leucine rich proteoglycan family regulates multiple signalling pathways in neural development and maintenance. **Development, Growth and Differentiation**, Nagoya, 54, n. 3, p. 327-340, 2012.

DENOIX, J.M. et al. A review of terminology for equine juvenile osteochondral conditions (JOCC) based on anatomical and functional considerations. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 29-35, 2013a.

DENOIX, J.M. et al. Radiographic findings of juvenile osteochondral conditions detected in 392 foals using a field radiographic protocol. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 44-51, 2013b.

DESJARDIN, C. et al. Involvement of mitochondrial dysfunction and ER-stress in the physiopathology of equine osteochondritis dissecans (OCD). **Experimental and Molecular Pathology**, nova Iorque, v. 96, n. 3, p. 328-338, 2014.

DESMOND-HELLMANN, S. et al. **Toward precision medicine**: building a knowledge network for biomedical research and a new taxonomy of disease. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.

DISTL, O. The genetics of equine osteochondrosis. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 13-18, 2013.

DOEGE, K.J. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 2, p. 894-902, 1991.

DONABEDIAN, M. et al. Early changes in biomarkers of skeletal metabolism and their association to the occurrence of osteochondrosis (OC) in the horse. Equine Veterinary Journal, Suffolk, v. 40, n. 3, p. 253-259, 2008.

DOSS, F. et al. Elevated IL-6 levels in the synovial fluid of osteoarthritis patients stem from plasma cells. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, Stockholm, v. 36, n. 2, p. 136-139, 2007.

DREIER, R. Hypertrophic differentiation of chondROCytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. Arthritis Research and Therapy, Londres, v. 12, n. 5, p. 216, 2010.

DUAN, X. et al. Therapeutic efficacy of intra-articular hyaluronan derivative and platelet-rich plasma in mice following axial tibial loading. **Plos One**, San Francisco, v. 12, n. 4, p.e0175682, 2017.

DUBOIS et al. Computed tomographic imaging of subchondral fatigue cracks in the distal end of the third metacarpal bone in the thoroughbred racehorse can predict crack micromotion in an ex-vivo model. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. e101230, 2014.

DUBUC, J. et al. Equine meniscal degeneration is associated with medial femorotibial osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 50, n. 1, p. 133-140, 2018.

DUESTERDIECK-ZELLMER, K. et al. Age-related differential gene and protein expression in postnatal cartilage canal and osteochondral junction chondROCytes. **Gene Expression Patterns**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2015.

DU SOUICH, P. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 142, n. 3, p. 362-374, 2014.

DUYGU, G. et al. The effects of high molecular weight hyaluronic acid (Hylan G-F 20) on experimentally induced temporomandibular joint osteoartrosis: part II. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 40, n. 12, p. 1406-1413, 2011.

EDMONDS, E.W.; POLOUSKY, J. A review of knowledge in osteochondritis dissecans: 123 years of minimal evolution from König to the ROCK study group. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 47, n. 4, p. 1118-1126, 2013.

EL-HAKIM, I.E.; ELYAMANI, A.O. Preliminary evaluation of histological changes found in a mechanical arthropatic temporomandibular joint (TMJ) exposed to an intra-articular Hyaluronic acid (HA) injection, in a rat model. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, Stuttgart, v. 39, n.8, p. 610-614, 2011.

ENGILES, J.B. et al. A diagnostic pathologist's guide to carpal disease in racehorses. **Journal** of Veterinary Diagnostic Investigation, Columbia, v. 29, n. 4, p. 414-430, 2017.

ESKO, J.D. et al. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R.D.; ESKO, J.D.; FREEZE, H.H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C.R.; HART, G.W.; ETZLER, M.E. (Ed). **Essentials of Glycobiology**. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009, cap. 16.

ESSER, P.R. et al. Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e41340, 2012.

FINDLAY, D.M.; KULIWABA, J.S. Bone-cartilage crosstalk: a conversation for understanding osteoarthritis. **Bone Research**, Chengdu, v. 4, p. 16028, 2016.

FOSANG, A.J. et al. The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 27, p. 19470-19474, 1992.

FOYEZ, T. et al. Microglial keratan sulfate epitope elicits in central nervous tissues of transgenic model mice and patients with amyotrophic lateral sclerosis. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 185, n. 11, p. 3053-3065, 2015.

FRANSEN, M. et al. Glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: a double-blind randomised placebo-controlled clinical trial evaluating single and combination regimens. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Londres, v. 74, n. 5, p. 851-858, 2015.

FRAZER, et al. The impact of subchondral bone cysts on local bone stresses in the medial femoral condyle of the equine stifle joint. **Medical Engineering and Physics**, Oxford, v. 48, p. 158-167, 2017.

FRISBIE, D.D. et al. Measurement of synovial fluid and serum concentrations of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 3, p. 306-309, 1999.

FRISBIE, D.D. et al. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 16, n. 10, p. 1196-1204, 2008.

FUNATO, S. et al. Extracellular matrix loss in chondROCytes after exposure to interleukin-1 β in NADPH oxidase-dependent manner. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 368, n. 1, p. 135-144, 2017.

FUNDERBURGH, J.L. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. **Glycobiology**, Nova Iorque, v. 10, n. 10, p. 951-958, 2000.

FUNDERBURGH, J.L. Keratan sulfate biosynthesis. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, Philadelphia, v. 54, n. 4, p. 187-194, 2002.

GALOIS, L. et al. Ambivalent properties of hyaluronate and hylan during post-traumatic OA in the rat knee. **Bio-Medical Materials and Engineering**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 235-242, 2012.

GAO, C. et al. A keratan sulfate disaccharide prevents inflammation and the progression of emphysema in murine models. American journal of physiology. **Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 312, n. 2, p. L268-L276, 2017.

GARCIA, B. et al. Differential Expression of Proteoglycans by Corneal Stromal Cells in Keratoconus. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 57, n. 6, p. 2618-2628, 2016.

GARVICAN, E.R. et al. Chondrocytes harvested from osteochondritis dissecans cartilage are able to undergo limited in vitro chondrogenesis despite having perturbations of cell phenotype in vivo. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 8, p. 1133-1140, 2008.

GOLDRING, S.R.; GOLDRING, M.B. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. **Nature Reviews**, Nova Iorque, v. 12, n. 11, p. 632-644, 2016.

GOLDRING, M.B.; TSUCHIMOCHI, K.; IJIRI, K. The control of chondrogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, Nova Iorque, v. 97, n. 1, p. 33-34, 2006.

GUPTA, R.C. et al. Comparative therapeutic efficacy and safety of type-II collagen (UC-II), glucosamine and chondroitin in arthritic dogs: pain evaluation by ground force plate. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlim, v. 96, n. 5, p. 770-777, 2012.

HADLEY, J.A. et al. Bone sialoprotein keratan sulfate proteoglycan (BSP-KSPG) and FGF-23 are important physiological components of medullary bone. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology**, v. 194, p. 1-7, 2016.

HAGGETT, E.F. et al. Necrosis of the femoral condyles in a four-week-old foal: clinical, imaging and histopathological features. **Equeine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 41, p. 91-95, 2012. Supplement.

HALPER, J. Proteoglycans and diseases of soft tissues. Advances in Experimental Medicine and Biology, Nova Iorque, v. 802, p. 49-58, 2014.

HASHIZUME, M. et al. High molecular weight hyaluronic acid relieved joint pain and prevented the progression of cartilage degeneration in a rabbit osteoarthritis model after onset of arthritis. **Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association**, Toquio, v. 20, n. 5, p. 432-438, 2010.

HASHIZUME, M.; MIHARA, M. Desirable effect of combination therapy with high molecular weight hyaluronate and NSAIDs on MMP production. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 17, n. 11, p. 1513-1518, 2009.

HAYASHI, M.; KADOMATSU, K.; ISHIGURO, N. Keratan sulfate suppresses cartilage damage and ameliorates inflammation in an experimental mice arthritis model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 401, n. 3, p. 463-468, 2010.

HAYASHI, M. et al. Keratan sulfate and related murine glycosylation can suppress murine cartilage damage in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 409, n. 4, p. 732, 737, 2011.

HENROTIN et al. Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, Londres, v. 2, n. 6, p. 335-348, 2010.

HEINEMEIER, K.M. et al. Radiocarbon dating reveals minimal collagen turnover in both healthy and osteoarthritic human cartilage. **Science Translational Medicine**, Washington, DC, v. 8, n. 346, p. 346ra90, 2016.

HEINEGARD, D. Fell-Muir Lecture: Proteoglycans and more--from molecules to biology. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 90, n. 6, p. 575-586, 2009.

HEINEGARD, D.; SAXNE, T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. **Nature reviews. Rheumatology**, Nova Iorque, v. 7, n. 1, p. 50-56, 2011.

HENROTIN, Y.; LAMBERT, C.; RICHETTE, P. Importance of synovitis in osteoarthritis: evidence for the use of glycosaminoglycans against synovial inflammation. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Londres, v. 43, n. 5, p. 579-587, 2014.

HILLA, D. DISTL, O. Prevalence of osteochondral fragments, osteochondrosis dissecans and palmar/plantar osteochondral fragments in Hanoverian Warmblood horses. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v. 126, n. 5-6, p. 236-244, 2013.

HIRAOKA, N. et al. Intra-articular injection of hyaluronan restores the aberrant expression of matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritic subchondral bone. Journal of Orthopaedic **Research**, Nova Iorque, v. 29, n. 3, p. 354-360, 2011.

HITCHENS, P.L. et al. An epidemiological analysis of equine welfare data from regulatory inspections by the official competent authorities. **Animal**, Cambridge, v. 11, n. 7, p. 1237-1248, 2017.

HITCHENS, P.L. et al. Mathematical modelling of bone adaptation of the metacarpal subchondral bone in racehorses. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, Berlin, 2018.

HOCHBERG, M.C. Structure-modifying effects of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: an updated meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of 2-year duration. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 18, p. S28-S31, 2010. Supplement 1

HOCHBERG, M. et al. Symptom and structure modification in osteoarthritis with pharmaceutical-grade chondroitin sulfate: what's the evidence? **Current Medical Research and Opinion**, Londres, v. 29, n. 3, p. 259-267, 2013.

HOCHBERG, M.C. et al. Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Londres, v. 75, n. 1, p. 37-44, 2016.

HOPPER, N.; SINGER, E.; HENSON, F. Increased sclerostin associated with stress fracture of the third metacarpal bone in the Thoroughbred racehorse. **Bone and Joint Research**, Londres, v. 7, n. 1, p. 94-102, 2018.

HSUEH, M.F.; ÖNNERFJORD, P.; KRAUS, V.B. Biomarkers and proteomic analysis of osteoarthritis. Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology, Stuttgart, v. 39, p. 56-66, 2014.

HUBBARD, C. et al. The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 418, n. 1-2, p. 21-31, 2012.

HUDETZ, D. et al. The Effect of Intra-articular Injection of Autologous Microfragmented Fat Tissue on Proteoglycan Synthesis in Patients with Knee Osteoarthritis. **Genes** 8, n. 10, p. E270, 2017.

HUI, A.Y. et al. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, Hoboken, v. 4, n. 1, p. 15-37, 2012.

HUNZIKER, E.B.; KAPFINGER, E.; GEISS, J. The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized pROCess of tissue resorption and neoformation during postnatal development. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 15, n. 4, p. 403-413, 2007. HYLDAJL, R.D. et al. Running decreases knee intra-articular cytokine and cartilage oligomeric matrix concentrations: a pilot study. European journal of applied physiology and occupational physiology, v. 116, n. 11-12, p. 2305-2314, 2016.

IANNITTI, T. et al. Preliminary histopathological study of intra-articular injection of a novel highly cross-linked hyaluronic acid in a rabbit model of knee osteoarthritis. **Journal of Molecular Histology**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 191-201, 2013.

IMADA, K. et al. Anti-arthritic action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondROCytes and synovial fibroblasts. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v. 33, n. 3, p. 410-414, 2010.

ISNARD, N.; ROBERT, L.; RENARD, G. Effect of sulfated GAGs on the expression and activation of MMP-2 and MMP-9 in corneal and dermal explant cultures. **Cell Biology International**, Londres, v. 27, n. 9, p. 779-784, 2003.

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

JACQUET, S. et al. Evolution of radiological findings detected in the limbs of 321 young horses between the ages of 6 and 18 months. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 58-64, 2013.

JANES, J.G. et al. Common lesions of the distal end of the third metacarpal/metatarsal bone in racehorse catastrophic breakdown injuries. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 29, n. 4, p. 431-436, 2017.

JANSEN, E.J. et al. One intra-articular injection of hyaluronan prevents cell death and improves cell metabolism in a model of injured articular cartilage in the rabbit. **Journal of Orthopaedic Research**, Nova Iorque, v. 25, n. 5, p. 624-630, 2008.

JAY, G.D.; WALLER, K.A. The biology of lubricin: near frictionless joint motion. Matrix Biology, Stuttgart, v. 39, p. 17-24, 2014.

JIANG, D.; LIANG, J.; NOBLE, P.W. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. **Physiological Reviews**, Washington, v. 91, n. 1, p. 221-264, 2011.

JOMPHE, C. et al. Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factorkappaB in interleukin-1beta-stimulated chondROCytes. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, Copenhagen, v. 102, n. 1, p. 59-65, 2008.

KAMM, J.L.; NIXON, A.J.; WITTE, T.H. Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi. **Equine** Veterinary Journal, Suffolk, v. 42, n. 8, p. 693-699, 2010.

KAWCAK, C.E. et al. The role of subchondral bone in joint disease: a review. **Equine** Veterinary Journal, Suffolk, v. 33, n. 2, p. 120-126, 2001.

KEENEY, M.; LAI, J.H.; YANG, F. Recent progress in cartilage tissue engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v. 22, n. 5, p. 734-740, 2011.

KHAN, K.M.; SCOTT, A. Mechanotherapy: how physical therapists' prescription of exercise promotes tissue repair. **British Journal of Sports Medicine**, v. 43, n. 4, p. 247-252, 2009.

KAHN, M.K. et al. Age-related effects on markers of inflammation and cartilage metabolism in response to an intra-articular lipopolysaccharide challenge in horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 95, n. 2, p. 671-680, 2017.

KIANI, C. et al. Structure and function of aggrecan. **Cell Research**, Beijing, v. 12, n. 1, p. 19-32, 2002.

KIM, W. et al. Histologic and histomorphometric evaluation of midcarpal joint defects in Thoroughbreds raised with and without early conditioning exercise. American Journal of Veterinary Research, Chicago, v. 73, n. 4, p. 498-507, 2012.

KINSLEY, M.A.; SEMEVOLOS, S.A.; DUESTERDIECK-ZELLMER, K.F. Wnt/β-catenin signaling of cartilage canal and osteochondral junction chondROCytes and full thickness cartilage in early equine osteochondrosis. **Journal of orthopaedic research**, Nova Iorque, v. 33, n. 10, p. 1433-1438, 2015.

KRAUS, V.B. et al. OARSI Clinical Trials Recommendations: Soluble biomarker assessments in clinical trials in osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 23, n. 5, p. 686-697, 2015.

LACOURT, M. et al. Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 20, n. 6, p. 572-583, 2012.

LAMPRECHT, E.D.; WILLIAMS, C.A. Biomarkers of antioxidant status, inflammation, and cartilage metabolism are affected by acute intense exercise but not superoxide dismutase supplementation in horses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Nova Iorque, p. 920932, 2012.

LAUDER, R.M. Chondroitin sulphate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. **Complementary Therapies in Medicine**, Edinburgh, v. 17, n. 1, p. 56-62, 2009.

LAVERTY, S. et al. Excessive degradation of type II collagen in articular cartilage in equine osteochondrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, Nova Iorque, v. 20, n. 6, p. 1282-1289, 2002.

LAVERTY, S.; GIRARD, C. Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 3-12, 2013.

LAWLESS, B.M. et al. Viscoelasticity of articular cartilage: Analysing the effect of induced stress and the restraint of bone in a dynamic environment. **Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v. 75, p. 293-301, 2017.

LECOCQ, M. et al. Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: early events on the pathway to equine osteochondrosis? **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 40, n. 5, p. 442-454, 2008.

LEE, H.G.; COWMAN, M.K. An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 219, n. 2, p. 278-287, 1994.

LEGENDRE, F. et al. Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1beta-stimulated chondROCytes--study in hypoxic alginate bead cultures. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 16, n. 1, p. 105-114, 2008.

LEPEULE, J. et al. Association of growth, feeding practices and exercise conditions with the prevalence of Developmental Orthopaedic Disease in limbs of French foals at weaning. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 167-177, 2009.

LEPEULE, J. et al. A reliable severity scoring system for radiographic findings in the limbs of young horses. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 52-57, 2013a.

LEPEULE, J. et al. Association of growth, feeding practices and exercise conditions with the severity of the osteoarticular status of limbs in French foals. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 65-71, 2013b.

LETTRY, V. et al. Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay to detect keratan sulfate in equine serum. **The Japanese Journal of Veterinary Research**, Sapporo, v. 57, n. 4, p. 207-212, 2010.

LEY, C. et al. Interleukin-6 and tumour necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology. Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine, v. 54, n. 7, p. 346-351, 2007.

LI, J. et al. Hyaluronan injection in murine osteoarthritis prevents TGFbeta 1-induced synovial neovascularization and fibrosis and maintains articular cartilage integrity by a CD44-dependent mechanism. Arthritis Research and Therapy, Londres, v. 14, n. 3, p. R151, 2012.

LITWINIUK, M. et al. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. **Wounds**, King of Prussia, v. 28, n. 3, p. 78-88, 2016.

LOESER, R.F. Osteoarthritis year in review 2013: biology. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 21, n. 10, p.1436-1442, 2013.

LOTZ, M. et al. Republished: Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. **Postgraduate Medical Journal**, Londres, v. 90, n. 1061, p. 171-178, 2014.

LU, H.T. et al. Injectable hyaluronic-acid-doxycycline hydrogel therapy in experimental rabbit osteoarthritis. **BMC Veterinary Research**, Londres, v. 9, p. 68, 2013.

LUCIA, J.L. et al. Influence of an intra-articular lipopolysaccharide challenge on markers of inflammation and cartilage metabolism in young horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 6, p. 2693-2699, 2013.

MA, N. et al. Comparison of the effects of exercise with chondroitin sulfate on knee osteoarthritis in rabbits. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, Londres, v. 13, n. 1, p. 16, 2018.

MACHADO, et al. Synovial fluid chondroitin sulphate indicates abnormal joint metabolism in asymptomatic osteochondritic horses. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 44, n. 4, p. 404-411, 2012.

MACKINNON, M.C. et al. Analysis of stress fractures associated with lameness in Thoroughbred flat racehorses training on different track surfaces undergoing nuclear scintigraphic examination. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 47, n. 3, p. 296-301, 2015.

MAEDA, Y.; HANADA, M.; OIKAWA, M.A. Epidemiology of racing injuries in Thoroughbred racehorses with special reference to bone fractures: Japanese experience from the 1980s to 2000s. **Journal of Equine Science**, Tokio, v. 27, n. 3, p. 81-87, 2016.

MAKELA, J.T. et al. Very early osteoarthritis changes sensitively fluid flow properties of articular cartilage. **Journal of Biomechanics**, Nova Iorque, v. 48, n. 12, p. 3369-3376, 2015.

MALEKIPOUR, F. et al. Shock absorbing ability of articular cartilage and subchondral bone under impact compression. **Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v. 26, p. 127-135, 2013.

MALEKIPOUR, F.; OETOMO, D.; LEE, P.V. Equine subchondral bone failure threshold under impact compression applied through articular cartilage. **Journal of Biomechanics**, Nova Iorque, v. 49, n. 10, p. 2053-2059, 2016.

MANINCHEDDA, U. et al. Development of an equine groove model to induce metacarpophalangeal osteoarthritis: a pilot study on 6 horses. **Plos One**, Sao Francisco, v. 10, n. 2, p. e0115089, 2015.

MANSFIELD, J.C.; BELL, J.S.; WINLOVE, C.P. The micromechanics of the superficial zone of articular cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 23, n. 10, p. 1806-1816, 2015.

MARCELLIN, E.; STEEN, J.A.; NIELSEN, L.K. Insight into hyaluronic acid molecular weight control. Applied microbiology and biotechnology, Berlin, v. 98, n. 16, p. 6947-6956, 2014.

MARTEL, G. et al. Differences in the vascular tree of the femoral tROChlear growth cartilage at osteochondrosis-susceptible sites in foals revealed by SWI 3T MRI. **Journal of Orthopaedic Research**, Nova Iorque, v. 34, n. 9, p. 15-39-1546, 2016a.

MARTEL, G. et al. Femoral epiphyseal cartilage matrix changes at predilection sites of equine osteochondrosis: Quantitative MRI, second-harmonic microscopy, and histological findings. **Journal of Orthopaedic Research**, Nova Iorque, v. 34, n. 10, p. 1743-1752, 2016b.

MARTEL, G. et al. Ultrasonographic screening for subclinical osteochondrosis of the femoral tROChlea in foals (28-166 days old): a prospective farm study. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, p.1-9, 2017.

MARTEL-PELLETIER, J. et al. First-line analysis of the effects of treatment on progression of structural changes in knee osteoarthritis over 24 months: data from the osteoarthritis initiative progression cohort. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Londres, v. 74, n. 3, p. 547-556, 2015.

MARTIG, S. et al. Bone fatigue and its implications for injuries in racehorses. Equine Veterinary Journal, Suffolk, v. 46, n. 4, p. 408-415, 2014.

MARTIN-ALARCON, L.; SCHMIDT, T.A. Rheological effects of macromolecular interactions in synovial fluid. **Biorheology**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 49-67, 2016.

MATSUI, H. et al. Keratan sulfate expression in microglia is diminished in the spinal cord in experimental autoimmune neuritis. **Cell Death and Disease**, Londres, v. 4, p. e946, 2013.

MATSUMOTO, K. et al. Distinct interaction of versican/PG-M with hyaluronan and link protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 42, p. 41205-41212, 2003.

MCCARTY, C.A. et al. Effect of hoof angle on joint contact area in the equine metacarpophalangeal joint following simulated impact loading ex vivo. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 47, n. 6, p. 715-720, 2015.

MCCARTY, C.A. et al. Finite-Element Analysis of Bone Stresses on Primary Impact in a Large-Animal Model: The Distal End of the Equine Third Metacarpal. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0159541, 2016.

MCCOY, A.M. et al. Articular osteochondrosis: a comparison of naturally-occurring human and animal disease. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 21, n. 11, p. 1638-1647, 2013.

MCCOY, A.M. et al. Identification and validation of risk loci for osteochondrosis in standardbreds. **BMC Genomics**, Londres, v. 17, p. 41, 2016.

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

MCILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D.; KAWCAK, C.E. Evaluation of intramuscularly administered sodium pentosan polysulfate for treatment of experimentally induced osteoarthritis in horses. **American Journal of Veterinary Research,** Chicago, v. 73, n. 5, p. 628-633, 2012a.

MCILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D.; KAWCAK, C.E. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. **Bone and Joint Research**, Londres, v. 1, n. 11, p. 297-309, 2012b.

MCILWRAITH, C.W.; CLEGG, P.D. Science in brief: Report on the Havemeyer Foundation workshop on equine musculoskeletal biomarkers--current knowledge and future needs. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 46, n. 6, p. 651-653, 2014.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; VAN WEEREN, P. R. Joint

disease in the horse. 2^a edição ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016.

MCILWRAITH, C.W. et al. Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, Nova Iorque, 2017.

MCILWRAITH, C.W.; VAN SICKLE, D.C. Experimentally induced arthritis of the equine carpus: histologic and histochemical changes in the articular cartilage. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 42, n. 2, p 209-217, 1981.

MEYER, K. et al. The mucopolysaccharides of the cornea. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 205, p. 611-616, 1953.

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

MICHELACCI, Y.M.; DIETRICH, C.P. Structure of chondroitin sulfates. Analyses of the products formed from chondroitin sulfates A and C by the action of the chondroitinases C and AC from Flavobacterium heparinum. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 451, n. 2, p. 436-443, 1976.

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

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

MIGLIORE, A.; PROCOIO, S. Effectiveness and utility of hyaluronic acid in osteoarthritis. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, Roma, v. 12, n. 1, p. 31-33, 2015.

MIKAMI, T.; KITAGAWA, H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. **Biochimica** et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1830, n. 10, p. 4719-4733, 2013.

MILLER, R.E.; MILLER, R.J.; MALFAIT, A.M. Osteoarthritis joint pain: the cytokine connection. **Cytokine**, Philadelphia, v. 70, n. 2, p. 185-193, 2014.

MIRAMS, M. et al. Altered gene expression in early osteochondrosis lesions. Journal of Orthopaedic Research, Nova Iorque, v. 27, n. 4, p. 452-457, 2009.

MISUMI, K. et al. Serum level of cartilage oligomeric protein (COMP) in equine osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 34, n. 6, p. 602-608, 2002.

MIYAKOSHI et al. A retrospective study of radiographic abnormalities in the repositories for Thoroughbreds at yearling sales in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Toquio, v. 79, N. 11, P. 1807-1814, 2017.

MOBASHERI, A.; HENROTIN, Y. Biomarkers of (osteo)arthritis. **Biomarkers: biochemical** indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals, Londres, v. 20, n. 8, p. 513-518, 2015.

MOHRING, D. Molecular weights of hyaluronic acids and the influence of phenylbutazone. **Ärztliche Forschung,** München-Gräfelfing, v. 12, n. 2, p. V68-V70, 1958.

MORAES, A.P. et al. Short- and long-term effects of platelet-rich plasma upon healthy equine joints: Clinical and laboratory aspects. **The Canadian Veterinary Jornal**, Guelph, v. 56, n. 8, p. 831-838, 2015.

MOREIRA, J.J. et al. Autologous pROCessed plasma: cytokine profile and effects upon injection into healthy equine joints. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 16, n. 1, p. 47-55, 2015.

MORITA, M. et al. Efficacy of Chondroitin Sulfate for Painful Knee Osteoarthritis: A One-Year, Randomized, Double-Blind, Multicenter Clinical Study in Japan. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v. 41, n. 2, p. 163-171, 2018.

MORT, J.S. et al. Early cathepsin K degradation of type II collagen in vitro and in vivo in articular cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 24, n. 8, p. 1461-1469, 2016.

MUELLER, M.B.; TUAN, R.S. Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. **PM and R**, Nova Iorque, v. 3, n. 6, p. S3-S11, 2011. Supplement 1.

MURAMATSU, Y. et al. Preventive effects of hyaluronan from deterioration of gait parameters in surgically induced mice osteoarthritic knee model. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 22, n. 6, p. 831-835, 2014.

MURATOVIC, D. et al. Bone matrix microdamage and vascular changes characterize bone marrow lesions in the subchondral bone of knee osteoarthritis. **Bone**, Elmsford, v. 108, p. 193-201, 2018.

MWALE, F. et al. The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. **Journal of Bone and Mineral Research**, Nova Iorque, v. 17, n. 2, p. 275-283, 2002.

NAKAJIMA, A. et al. Changes in synovial fluid biochemical markers following arthroscopic surgery in patients with knee osteoarthritis. **Rheumatology International**, Berlim, v. 33, n. 1, p. 209-214, 2013.

NAKAYAMA, F. et al. Sulfation of keratan sulfate proteoglycan reduces radiation-induced apoptosis in human Burkitt's lymphoma cell lines. **Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdam, v. 587, n. 2, p. 231-237, 2013.

NEUENSCHWANDER, H.M. **Comparação dos efeitos da aplicação intra-articular de AH de diferentes pesos moleculares em modelos de sinovite aguda induzida por LPS em equinos**. 2016. 81 f. Dissertação (mestrado)– Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, São Paulo, 2016.

NEUNDORF, R.H. et al. Determination of the prevalence and severity of metacarpophalangeal joint osteoarthritis in Thoroughbred racehorses via quantitative macroscopic evaluation. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 71, n. 11, p. 1284-1293, 2010.

NICKIEN, M.; THAMBYAH, A.; BROOM, N.D. How a decreased fibrillar interconnectivity influences stiffness and swelling properties during early cartilage degeneration. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v. 75, p. 390-398, 2017.

NIEMINEN, H.J. et al. Determining collagen distribution in articular cartilage using contrastenhanced micro-computed tomography. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 23, n. 9, p. 1613-1621, 2015.

NILSSON, G.; OLSSON, S.E. Radiologic and patho-anatomic changes in the distal joints and the phalanges of the standardbred horse. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Stockholm, v. 44, n. 0, p. 1-57, 1973. Supplementum.

NOBLE, P.; SINGER, E.R.; JEFFERY, N.S. Does subchondral bone of the equine proximal phalanx adapt to race training? **Journal of Anatomy**, Londres, v. 229, n. 1, p. 104-113, 2016.

NOVAKOFSKI, K.D. et al. Joint-dependent response to impact and implications for posttraumatic osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 23, n. 7, p. 1130-1137, 2015.

OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. Establishment of a monoclonal antibody (1/14/16H9) for detection of equine keratan sulfate. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 59, n. 10, p. 1203-1208, 1998.

OLSSON, S.E.; REILAND, S. The nature of osteochondrosis in animals. Summary and conclusions with comparative aspects on osteochondritis dissecans in man. Acta Radiologica. **Supplement**, Copenhagen, v. 358, p. 299-306, 1978.

OLSSON, L. et al. Distribution of keratan sulphate and chondroitin sulphate in wild type and white mutant axolotl embryos during neural crest cell migration. **Pigment Cell Research**, Nova Iorque, v. 9, n. 1, p. 5-17, 1996.

OLSTAD, K. et al. Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. 25, n. 8, p. 1094-1105, 2007.

OLSTAD, K. et al. Epiphyseal cartilage canal blood supply to the tarsus of foals and relationship to osteochondrosis. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 40, n. 1, p. 30-39, 2008a.

OLSTAD, K. et al. Epiphyseal cartilage canal blood supply to the distal femur of foals. **Equine** Veterinary Journal, Suffolk, v. 40, n. 5, p. 433-439, 2008b.

OLSTAD, K. et al. Epiphyseal cartilage canal blood supply to the metatarsophalangeal joint of foals. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 41, n. 9, p. 865-871, 2009.

OLSTAD, K. et al. Early lesions of articular osteochondrosis in the distal femur of foals. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 48, n. 6, p. 1165-1175, 2011.

OLSTAD, K. et al. Transection of vessels in epiphyseal cartilage canals leads to osteochondrosis and osteochondrosis dissecans in the femoro-patellar joint of foals; a potential model of juvenile osteochondritis dissecans. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 21, n. 5, p. 730-738, 2013.

OLSTAD, K. et al. Osteochondrosis Can Lead to Formation of Pseudocysts and True Cysts in the Subchondral Bone of Horses. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 52, n. 5, p. 862-872, 2015.

OLSTAD, K.; EKMAN, S.; CARLSON, C.S. An Update on the Pathogenesis of Osteochondrosis. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 52, n. 5, p. 785-802, 2015.

ORLOWSKY, E.W.; KRAUS, V.B. The role of innate immunity in osteoarthritis: when our first line of defense goes on the offensive. **The Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 42, n. 3, p. 363-371, 2015.

OSAGO, H. et al. Quantitative analysis of glycosaminoglycans, chondroitin/dermatan sulfate, hyaluronic acid, heparan sulfate, and keratan sulfate by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 467, p. 62-74, 2014.

OSAWA, A. et al. Activation of genes for growth factor and cytokine pathways late in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. **Genomics**, San Diego, v. 88, n. 1, p. 52-64, 2006.

ORLOWSKY, E.W. et al. Monosodium urate crystal induced macrophage inflammation is attenuated by chondroitin sulphate: pre-clinical model for gout prophylaxis? **BMC Musculoskeletal Disorders**, Londres, v. 15, p. 318, 2014.

PARK, J.Y.; PILLINGER, M.H.; ABRAMSON, S.B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. **Clinical Immunology**, v. 119, n. 3, p. 229–240, 2006

PATEL, D.A. et al. Novel CHST6 gene mutations in 2 unrelated cases of macular corneal dystrophy. **Cornea**, Nova Iorque, v. 30, n. 6, p. 664-669, 2011.

PEAT, F.J.; KAWCAK, C.E. Musculoskeletal pathology. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**. Philadelphia, v. 31, n. 2, p. 407-424, 2015.

PEFFERS, M.J. et al. Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging identifies markers of ageing and osteoarthritic cartilage. Arthritis Research and Therapy, Londres, v. 16, n. 3, p. R110, 2014.

PEFFERS, M.J. et al. Comprehensive protein profiling of synovial fluid in osteoarthritis following protein equalization. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 23, n. 7, p. 1204-1213, 2015.

PEFFERS, M.J.; THORNTON, D.J.; CLEGG, P.D. Characterization of neopeptides in equine articular cartilage degradation. **Journal of Orthopaedic Research**, Nova Iorque, v. 34, n. 1, p. 106-120, 2016.

PINILLA, M.J. et al. Histological Features of the Distal Third Metacarpal Bone in Thoroughbred Racehorses, With and Without Lateral Condylar Fractures. Journal of Comparative Pathology, Liverpool, v. 157, n. 1, p. 1-10, 2017.

PLAAS, A. et al. Intraarticular injection of hyaluronan prevents cartilage erosion, periarticular fibrosis and mechanical allodynia and normalizes stance time in murine knee osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, Londres, v. 13, n. 2, p. R46, 2011.

POURAN, B. et al. Solute transport at the interface of cartilage and subchondral bone plate: Effect of micro-architecture. **Journal of Biomechanics**, Nova Iorque, v. 52, p. 148-154, 2017.

POMIN, V.H. et al. Residual keratan sulfate in chondroitin sulfate formulations for oral administration. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 839-846, 2012.

POMIN, V.H. Keratan sulfate: an up-to-date review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 72, p. 282-289, 2015.

POURAN, B. et al. Non-enzymatic cross-linking of collagen type II fibrils is tuned via osmolality switch. **Journal of Orthopaedic Research**, Nova Iorque, 2018.

POWER, J. et al. Alterations in sclerostin protein in lesions of equine osteochondrosis. **Veterinary Record**, Londres, v. 1, n. 1, p.e000005, 2014.

PRAUD, A. et al. Effects of management practices as risk factors for juvenile osteochondral conditions in 259 French yearlings. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 72-76, 2013.

PUHAKKA, P.H. et al. Estimation of articular cartilage properties using multivariate analysis of optical coherence tomography signal. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 23, n. 12, p. 2206-2213, 2015.

RAHMATI, M. et al. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. **Aging Research Reviews**, Oxford, v. 40, p. 20-30, 2017.

RAMME, A.J. et al. A novel rat model for subchondral microdamage in acute knee injury: a potential mechanism in post-traumatic osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 24, n. 10, p. 1776-1785, 2016.

REED, S.R. et al. Descriptive epidemiology of joint injuries in Thoroughbred racehorses in training. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 44, n. 1, p. 13-19, 2012.

REED, S.R. et al. Exercise affects joint injury risk in young Thoroughbreds in training. **Veterinary Journal**, Londres, v. 196, n. 3, p. 339-344, 2013.

REESINK, H.L. Lubricin/proteoglycan 4 increases in both experimental and naturally occurring equine osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 25, n. 1, p. 128-137, 2017.

RIDDICK, T.L.; DUESTERDIECK-ZELLMER, K.; SEMEVOLOS, S.A. Gene and protein expression of cartilage canal and osteochondral junction chondROCytes and full-thickness

cartilage in early equine osteochondrosis. **Veterinary Journal**, Londres, v. 194, n. 3, p. 319-325, 2012.

ROBERT, C. et al. Study design for the investigation of likely aetiological factors of juvenile osteochondral conditions (JOCC) in foals and yearlings. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 36-43, 2013.

ROSANOWSKI et al. Descriptive epidemiology of veterinary events in flat racing Thoroughbreds in Great Britain (2000 to 2013). **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 49, n. 3, p. 275-281, 2017.

ROUGHLEY, P.J.; MORT, J.S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. **Journal of Experimental Orthopaedics**, Heidelberg, v. 1, n. 1, p. 8, 2014.

RUPPERT, S.M., et al. Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. **Immunologic Research**, Basel, v. 58, n. 2, p. 186-192, 2014.

SÄÄMÄNEN, A.M. et al. Levels of chondroitin-6-sulfate and nonaggregating proteoglycans at articular cartilage contact sites in the knees of young dogs subjected to moderate running exercise. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 32, n. 10, p. 1282-1292, 1989.

SANCHES, M. et al. Chondroitin sulfate and glucosamine sulfate associated to photobiomodulation prevents degenerative morphological changes in an experimental model of osteoarthritis in rats. **Lasers in Medical Science**, Londres, 2017.

SANCHEZ LAZARO, J.A. et al. The role of different hyaluronic acids in the articular cartilage of rabbit. **The Open Orthopaedics Jornal**, Hilversum, v. 4, p. 44-47, 2010.

SANDY, J.D. et al. Isolation and characterization of disulfide-bonded peptides from the three globular domains of aggregating cartilage proteoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, 265, n. 34, p. 21108-21113, 1990.

SASARMAN, F. et al. Biosynthesis of glycosaminoglycans: associated disorders and biochemical tests. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Lancaster, v. 39, n. 2, p. 173-188, 2016.

SHAH, Y.Y. et al. Magnetic particle translation as a surrogate measure for synovial fluid mechanics. **Journal of Biomechanics**, Nova Iorque, v. 60, p. 9-14, 2017.

SHINGLETON, W.D. et al. Cartilage canals in equine articular/epiphyseal growth cartilage and a possible association with dyschondroplasia. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 29, n. 5, p. 360-364, 1997.

SEMEVOLOS, S.A.; NIXON, A.J.; BROWER-TOLAND, B.D. Changes in molecular expression of aggrecan and collagen types I, II, and X, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta1 in articular cartilage obtained from horses with naturally acquired osteochondrosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1088-1094, 2001.

SEMEVOLOS, S.A. Osteochondritis Dissecans Development. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, Philadelphia, v. 33, n. 2, p. 367-378, 2017.

SERTEYN, D. et al. Gene expression profiling from leukocytes of horses affected by osteochondrosis. Journal of Orthopaedic Research, Nova Iorque, v. 28, n. 7, p. 965-970, 2010.

SILVA, M.M. Desenvolvimento de protocolo de avaliação, por determinação de escore, das alterações encontradas nas doenças articulares emm equinos e sua correlação com evolução após tratamento. 2014, 94f. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia. São Paulo, 2014.

SKIÖLDEBRAND, E. et al. Enhanced concentration of COMP (cartilage oligomeric matrix protein) in osteochondral fractures from racing Thoroughbreds. Journal of Orthopaedic **Research**, v. 23, n. 1, p. 156-163, 2005.

SKIÖLDEBRAND, E. et al. Cartilage oligomeric matrix protein neoepitope in the synovial fluid of horses with acute lameness: A new biomarker for the early stages of osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 49, n. 5, p. 662-667, 2017.

SMITH, M.M. et al. Significant synovial pathology in a meniscectomy model of osteoarthritis: modification by intra-articular hyaluronan therapy. **Rheumatology**, Oxford v. 47, n. 8, p. 1172-1178, 2008.

SMITH, M.D. The normal synovium. **The Open Rheumatology Journal**, Hilversum, v. 5, p. 100-106, 2011.

SMITH, M.R.; WRIGHT, I.M. Radiographic configuration and healing of 121 fractures of the proximal phalanx in 120 Thoroughbred racehorses (2007-2011). **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 46, n. 1, p. 81-87, 2014.

SOBAL, G. et al. Preclinical evaluation of (99m)Tc labeled chondroitin sulfate for monitoring of cartilage degeneration in osteoarthritis. **Nuclear Medicine and Biology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 339-346, 2016.

SOMMARIN, Y. et al. Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 27, p. 16723-16729, 1998.

SPRACKMAN, L. et al. Relationship between the shape of the central and third tarsal bones and the presence of tarsal osteoarthritis. **Veterinary Journal**, Londres, v. 204, n. 1, p. 94-98, 2015.

STABLER, T.V. et al. Chondroitin sulphate inhibits NF-κB activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 25, n. 1, p. 166-174, 2017.

STOCK, K.F.; HAMANN, H. DISTL, O. Factors associated with the prevalence of osseous fragments in the limb joints of Hanoverian Warmblood horses. **Veterinary Journal**, Londres, v. 171, n. 1, p. 147-156.

STOVER, S.M. Nomenclature, classification, and documentation of catastrophic fractures and associated preexisting injuries in racehorses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 29, n. 4, p. 396-404, 2017.

SUGAHARA, K. et al. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. **Current Opinion in Structural Biology**, Londres, v. 13, n. 5, p. 612-620, 2003.

SUZUKI, M. Biochemical studies on carbohydrates: L. Prosthetic group of corneamucoid. **The Journal of Biochemistry**, Toquio, v.30, n. 2, p. 185-191, 1939.

SVALA, E. et al. An inflammatory equine model demonstrates dynamic changes of immune response and cartilage matrix molecule degradation in vitro. **Connective Tissue Research**, Nova Iorque, v. 56, n. 4, p. 315-325, 2015.

SVALA, E. et al. Characterisation of lubricin in synovial fluid from horses with osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 49, n. 1, p. 116-123, 2017.

TAKAHASHI, T. et al. A decrease in the molecular weight of hyaluronic acid in synovial fluid from patients with temporomandibular disorders. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 33, n. 4, p. 224-229, 2004.

TANNER, J.C. et al. The relationship of training milestones with racing success in a population of Standardbred horses in New Zealand. **New Zealand Veterinary Jornal**, Wellington, v. 59, n. 6, p. 323-327, 2011.

TAYLOR, K.R.; GALLO, R.L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 20, n. 1, p. 9-22, 2006.

TCHETVERIKOV, I. et al. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Londres, v. 64, n. 5, p. 694-698, 2005.

TE MOLLER, N.C.R.; VAN WEEREN, P.R. How exercise influences equine joint homeostasis. **Veterinary Journal**, Londres, v. 222, p. 60-67, 2017.

TERMEER, CC. et al. Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 165, n. 4, p. 1863-1870, 2000.

THE BIOMARKER DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and consensual frameworks. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 69, p. 89-95, 2001.

TIO, L. et al. Effect of chondroitin sulphate on synovitis of knee osteoarthritic patients. **Medicina Clínica**, Barcelona, v. 149, n.1, p. 9-16, 2017.

TIWARI, N. et al. Imaging of normal and pathologic joint synovium using nonlinear optical microscopy as a potential diagnostic tool. **Journal of Biomedical Optics**, Bellingham, v. 15, n. 5, p. 056001, 2010.

TODHUNTER, R.J. et al. Concentrations of keratan sulfate in plasma and synovial fluid from clinically normal horses and horses with joint disease. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 210, n. 3, p. 369-374, 1997.

TRANQUILLE, C.A.; MURRAY, R.C.; PARKIN, T.D. Can we use subchondral bone thickness on high-field magnetic resonance images to identify Thoroughbred racehorses at risk of catastrophic lateral condylar fracture? **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 49, n. 2, p. 167-171.

TROEBERG, L.; NAGASE, H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1824, n. 1, p. 133-145, 2012.

TSAI, W.Y. et al. Early intraarticular injection of hyaluronic acid attenuates osteoarthritis progression in anterior cruciate ligament-transected rats. **Connective Tissue Research**, Nova Iorque, v. 54, n. 1, p. 49-54, 2013.

TUNCAY, I. et al. The effect of hyaluronan combined with microfracture on the treatment of chondral defects: an experimental study in a rabbit model. **European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology**, Paris, v. 23, n. 7, p. 753-758, 2013.

TURLEY, S.M. et al. Microstructural changes in cartilage and bone related to repetitive overloading in an equine athlete model. **Journal of Anatomy**, Londres, v. 224, n. 6, p. 647-658, 2014.

UNITED STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE. Lameness and laminitis in U.S. horses. **National Animal Health Monitoring System**, Fort Collins, 2000.

ULRICH, S.D. et al. Distribution of Subchondral Bone Puncture Strength in the Talus and Tibial Plafond: A Biomechanical Study. **Foot and ankle specialist**, Thousand Oaks, v. 11, n. 1, p. 44-48, 2018.

VALACHOVA, K. et al. Hyaluronan in medical practice. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 23, n. 31, p. 3607-3617, 2016.

VALLIERES, M.; DU SOUICH, P. Modulation of inflammation by chondroitin sulfate. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 18, p. S1-S6, 2010. Supplement 1

VAN GREVENHOF, E.M. et al. Genetic variables of various manifestations of osteochondrosis and their correlations between and within joints in Dutch warmblood horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 6, p. 1906-1912, 2009.

VAN WEEREN, R. Equine biomechanics: from an adjunct of art to a science in its own right. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 44, n. 5, p. 506-508, 2012.

VAN WEEREN, P.R.; BACK, W. Musculoskeletal Disease in Aged Horses and Its Management. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**. Philadelphia, v. 32, n. 2, p. 229-247, 2016.

VAN WEEREN, P.R.; BARNEVELD, A. Study design to evaluate the influence of exercise on the development of the musculoskeletal system of foals up to age 11 months. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 31, p. 4-8, 1999. Supplement.

VAN WEERE, P.R.; DENOIX, J.M. The Normandy field study on juvenile osteochondral conditions: conclusions regarding the influence of genetics, environmental conditions and management, and the effect on performance. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 90-95, 2013.

VAN WEEREN, P.R.; JEFFCOTT, L.B. Problems and pointers in osteochondrosis: Twenty years on. **Veterinary Journal**, Londres, v. 197, n. 1, p. 96-102, 2013.

VENDRUSCOLO, C.P. Avaliação dos efeitos inflamatorio e oxidante do ozonio medicinal em articulações sinoviais de equinos hígidos. 2017. 92 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, São Paulo, 2017.

WAGONER, G.; COHN, B.N.E. Osteochondritis dissecans. Archives of Surgery, v. 23, n. 1, 1931.

WANG, D. et al. Evaluation of the Quality, Accuracy, and Readability of Online Patient Resources for the Management of Articular Cartilage Defects. **Cartilage**, Los Angeles, v. 8, n. 2, p. 112-118, 2017.

WATANABE, H. et al. Identification of hyaluronan-binding domains of aggrecan. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 44, p. 28057-28065, 1997.

WATANABE, Y. et al. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 is required for normal cartilage development. **The Biochemical Jornal**, Londres, v. 432, n. 1, p. 47-55, 2010.

WECHALEKAR, M.D.; SMITH, M.D. Utility of arthroscopic guided synovial biopsy in understanding synovial tissue pathology in health and disease states. **World Journal of Orthopedics**, Hong Kong, v. 5, n. 5, p. 566-573, 2014.

WEI, L. et al. Change of HA molecular size and boundary lubrication in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 37, n. 4, p. 271-277, 2010.

WELSH, C. E. et al. Preliminary genetic analyses of important musculoskeletal conditions of Thoroughbred racehorses in Hong Kong. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 198, n. 3, p. 611-615, 2013.

WILDI, L.M. et al. Chondroitin sulphate reduces both cartilage volume loss and bone marrow lesions in knee osteoarthritis patients starting as early as 6 months after initiation of therapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study using MRI. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Londres, v. 70, n. 6, p. 982-989, 2011.

WILLIAMSON, A.J. Biomechanical testing of the calcified metacarpal articular surface and its association with subchondral bone microstructure in Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 50, n. 2, p. 255-260, 2018.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, Ł.A.; SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators of Inflammation**, Oxford, p. 561459, 2014.

WRIGHT, I.M.; MINSHALL, G.J. Identification and treatment of osteochondritis dissecans of the distal sagittal ridge of the third metacarpal bone. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk, v. 46, n. 5, p. 585-588, 2014.

WRIGHT, R.W. Osteoarthritis Classification Scales: Interobserver Reliability and Arthroscopic Correlation. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 96, n. 14, p. 1145-1151, 2014.

WYLIE, C.E. et al. Thoroughbred fatality and associated jockey falls and injuries in races in New South Wales and the Australian Capital Territory, Australia: 2009-2014. Veterinary Journal, Londres, v. 227, p. 1-7, 2017.

YOSHIOKA, Y. et al. Suppression of hyaluronan synthesis alleviates inflammatory responses in murine arthritis and in human rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 65, n. 5, p. 1160-1170, 2013.

YOSHIOKA, K. et al. Pharmacological effects of novel cross-linked hyaluronate, Gel-200, in experimental animal models of osteoarthritis and human cell lines. **Osteoarthritis Cartilage**, Londres, v. 22, n. 6, p. 879-887, 2014.

YTREHUS, B. et al. Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. **Bone**, Elmsford, v. 35, n. 6, p. 1294-1306, 2004a.

YTREHUS, B. et al. Experimental ischemia of porcine growth cartilage produces lesions of osteochondrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, Nova Iorque, v. 22, n. 6, p. 1201-1209, 2004b.

YTREHUS, B. et al. Vascularisation and osteochondrosis of the epiphyseal growth cartilage of the distal femur in pigs--development with age, growth rate, weight and joint shape. **Bone**, Elmsford, v. 34, n. 3, p. 454-465, 2004c.

YTREHUS, B.; CARLSON, C.S.; EKMAN, S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 44, n. 4, p. 429-448, 2007.

ZAIA, J. On-line separations combined with MS for analysis of glycosaminoglycans. **Mass Spectrometry Reviews**, Nova Iorque, v. 28, n. 2, p. 254-272, 2009.

ZAMLI, Z; SHARIF, M. ChondROCyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? **International Journal of Rheumatic Diseases**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 159-166, 2011.

ZHANG, M.; EGAN, B.; WANG, J. Epigenetic mechanisms underlying the aberrant catabolic and anabolic activities of osteoarthritic chondROCytes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 67, p. 101-109, 2015.

ZHANG, Z. et al. Intra-Articular Injection of Cross-Linked Hyaluronic Acid-Dexamethasone Hydrogel Attenuates Osteoarthritis: An Experimental Study in a Rat Model of Osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 4, p. 411, 2016.

ZHANG, Z. et al. Deficiency of a sulformsferase for sialic acid-modified glycans mitigates Alzheimer's pathology. **PROCeedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 114, n. 14, p. E2947-E2954, 2017.

ZHENG, J.; LUO, W.; TANZER, M.L. Aggrecan synthesis and secretion. A paradigm for molecular and cellular coordination of multiglobular protein folding and intracellular trafficking. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 21, p. 12999-13006, 1998.

10 APÊNDICES

APÊNDICE A

Mediana, média, desvio padrão e erro padrão da contagem de células nucleadas do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.

CONTROLE	FRATURAS	OA1	OA2	OA3	ОС
133	478	200	228	413	168
200	153	353	50	100	88
1318	350	550	140	375	93
50	178	100	88	20	250
230	25	195	50	375	123
115	75	200	375	650	68
240	163	1338	105		850
43	133	23	219		325
550	100	28	108		335
550	50	60			258
140	450	25			98
28	110	280			50
228	60				38
265	30				100
255	270				385
80	110				193
95	130				250
43	50				323
35	75				95
143	43				675
600	55				80
600					110
265					100
65					80
950					650
270					480
100					218
40					40
55					683
1000					305
100					480
358					813
120					55
300					50
100					125
175					173
200					68
300					95
280					40
2/3					203
123					250
184					230
180					400
109					85
					103
					275
					343
					138
					80
					18
					73
					100

						143
						13
						25
						110
						50
						28
						20
						80
						225
						350
						50
						138
						25
						150
						125
						60
Mediana	194,50	110,00	197,50	108,00	375,00	100,00
Média	258,82	147,05	279,33	151,44	322,17	182,38
DP	272,17	132,10	368,41	105,58	228,90	190,50
EP	40,57	28,83	102,18	33,39	93,45	22,30

APÊNDICE B

Mediana, média, desvio padrão e erro padrão da concentração de IL-1 β (pg/ml) do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.

	CONTROLE	FRATURAS	OA1	OA2	OA3	OC
	9,016	4,71	10,37	15,34	9,98	6,81
	10,37	4,29	7,35	9,21	7,35	5,26
	4,768	6,63	10,77	10,37	4,93	8,83
	7,71	8,83	5,94	13,21	4,29	14,05
	3,667	3,97	15,56	3,37	4,29	6,99
	11,164	4,29	5,77	11,97	4,77	8,45
	4,13	2,78	6,28	3,67	6,63	4,61
	6,99	4,29	5,10	14,48	16,43	7,37
	4,55	9,30	5,05	6,18	22,27	1,24
	3,25	7,37	4,26	5,33		10,67
	3,43	8,64	9,30	6,47		8,00
	3,62	8,00	3,51	14,34		7,69
	2,9		4,52	7,37		
	3,25			6,77		
	3,98					
	2,9					
	4,36					
	3,62					
	5,12					
	3,98					
	3,98					
	2,9					
	1,25					
	3,62					
	3,62					
	3,25					
	4,36					
	5,12					
	5,91					
	3,25					
Mediana	3,98	5,67	5,94	8,29	6,63	7,53
Média	4,67	6,09	7,21	9,15	8,99	7,50
DP	2,26	2,28	3,42	4,14	6,32	3,15
EP	0,41	0,66	0,95	1,11	2,11	0,91

APÊNDICE C

Mediana, média, desvio padrão e erro padrão da concentração de TNF α (pg/ml) do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.

	CONTROLE	FRATURAS	OA1	OA2	OA3	OC
	2,2	2,20	2,28	2,69	2,20	2,36
	1,88	2,53	2,53	2,53	3,20	2,36
	2,2	2,04	2,69	2,69	2,44	2,36
	2,2	1,88	4,45	2,20	2,20	2,61
	1,81	2,36	2,86	2,20	2,36	2,12
	2,04	2,36	1,88	2,69	2,53	1,58
	2,94	3,20	2,04	2,36	2,53	2,20
	1,81	2,04	1,88	2,53	3,11	5,71
	1,35	2,79	3,52	3,14	2,96	0,44
	1,52	4,12	2,79	2,46		3,71
	1,19	2,96	2,79	2,46		
	1,52	3,14	1,60	1,03		
	1,7	1,60	2,15	2,79		
	1,52					
	0,63					
	1,19					
	0,41					
	2,49					
	3,17					
	1,04					
	1,19					
	1,04					
	1,35					
	1,04					
	1,7					
	1,19					
	1,35					
	1,89					
	1,7					
	1,89					
Mediana	1,61	2,36	2,53	2,53	2,53	2,36
Média	1,64	2,56	2,57	2,44	2,61	2,55
DP	0,61	0,64	0,77	0,49	0,38	1,38
EP	0,11	0,18	0,21	0,14	0,13	0,44

APÊNDICE D

Mediana, média, desvio padrão e erro padrão da concentração de IL-6 (pg/ml) do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.

	CONTROLE	FRATURAS	OA1	OA2	OA3	OC
	5,28	4,14	3,40	7,40	4,42	4,42
	3,06	8,31	7,22	7,75	8,50	2,73
	5,43	4,84	3,90	5,58	2,62	8,50
	4,56	4,29	3,65	5,89	24,73	7,57
	1,77	5,74	7,22	3,90	3,52	4,42
	6,21	3,77	5,28	6,88	24,08	4,99
	4,70	5,45	4,03	5,28	12,03	3,40
	4,16	1,10	3,17	5,28		1,47
	2,56	1,67	2,42	3,37		3,73
	2,94		3,03	2,42		2,15
	6,04		6,22	5,21		4,32
	7,75		2,15	2,42		
	2,01			1,10		
	2,36			2,71		
	4,79					
	4,04					
	3,14					
	4,79					
	3,81					
	3,58					
	2,36					
	4,28					
	3,36					
	3,14					
	2,45					
	3,14					
	3,14					
	3,47					
	1,13					
	2,94					
Mediana	3,42	4,29	3,77	5,24	8,50	4,32
Média	3,75	4,37	4,31	4,66	11,41	4,34
DP	1,45	2,15	1,76	2,04	9,44	2,12
EP	0,26	0,72	0,51	0,55	3,57	0,64
APÊNDICE E

Mediana, média, desvio padrão e erro padrão da concentração de IL-10 (pg/ml) do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.

	CONTROLE	FRATURAS	OA1	OA2	OA3	OC
	19,60	34,37	126,00	92,33	48,83	20,13
	34,46	33,84	181,00	30,21	80,09	59,45
	55,84	17,55	113,00	48,83	37,59	26,71
	72,23	84,92	48,83	24,46	67,64	69,16
	7,25	25,01	73,79	29,03	53,00	26,14
	10,95	21,18	110,00	27,87	89,02	17,55
	35,08	107,00	123,00	119,00	28,45	22,80
	19,60	44,76	72,61	46,10	27,15	146
	59,26	39,68	36,31	72,61		123
	21,15	39,68	50,78	59,01		
	140,00		46,92	39,68		
	183,00		54,81	34,68		
	135,00		27,15	59,01		
	119,00					
	70,45					
	63,40					
	106,00					
	105,00					
	158,00					
	94,00					
	133,00					
	97,04					
	59,26					
	29,13					
	113					
	61,32					
	94,00					
	51,15					
	76,20					
Mediana	70,45	37,03	72,61	46,10	50,92	26,71
Média	76,67	44,80	81,86	52,52	53,97	56,77
DP	46,66	30,46	45,15	28,10	23,19	47,94
EP	8,66	9,63	12,07	7,79	8,20	15,98

APÊNDICE F

Mediana, média, desvio padrão e erro padrão da concentração de PGE_2 (pg/ml) do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.

	CONTROLE	FRATURAS	OA1	OA2	OA3	OC
	26,26	190,69	13,52	49,11	33,13	23,31
	30,30	490,38	448,58	21,32	60,31	5,93
	45,15	113,27	21,53	34,57	10,94	42,40
	51,46	65,60	34,15	153,50	34,25	10,16
	53,63	242,22	16,54	37,66	213,71	21,77
	36,51	47,82	37,80	110,85	598,14	22,35
	52,12	61,34	23,77	30,80	166,67	18,84
	29,42	42,98	155,87	5,90	215,73	16,04
	25,61	23,08	212,49	24,93	497,27	18,25
	38,27	301,16	9,25	33,29	296,71	9,38
	29,70	46,25	45,88	11,65		170,55
	80,46	119,48	31,91	257,58		28,91
	37,01	31,25	45,01	545,36		468,61
	103,69	125,91	43,36	179,01		24,42
	33,26	103,88	58,70	149,12		89,79
	26,05	17,53		112,42		16,18
	34,00	179,96				39,37
	10,57	403,90				20,73
	20.89	10.48				34.01
	94.52	8.29				51.96
	34.30	217.87				65.62
	28.10	143.73				87.62
	55.77	43.70				55.90
	11.15	156.62				47.28
	90.08	162.92				30.78
	19.73	50.81				15.98
	13.72	97.83				12,50
	60.00	423.06				11.51
	23.81	131.44				113 77
	14.02	287.76				25.92
	22.14	92.75				15.91
	13.46	233 74				12.80
	36.90	37.69				71.70
	26.07	157.56				16.92
	67.66	115.96				15,72
	17.93	84 21				17.66
	28.17	820.86				22.89
	6 50	93.60				14 77
	42.73	121 72				14,77
	9.87	64 69				
	20.66	127.57				
	17.26	127,57				
	8.13	409,12				
	11.28	18 55				
	11,20	133.00				
		120.10				
		127,10				
		576.20				
		375.63				
		575,05				
		205.40				
		13 15				
		38.89				
Madiana	28 00	J0,00 121 7105	37 8005	13 39675	100 10	22 621
Med:~	20,80	121,/195	37,0005	43,380/3	190,19	47.021
meata DP	34,90	172,07	116 27	109,82	212,09	47,00
FP	25,50	23.00	30.05	34.27	63.84	12.63
151	3,33	23,77	50,05	57,27	03,04	12,05
	I					

APÊNDICE G

Mediana, média, desvio padrão e erro padrão da concentração de KS (ng/ml) do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.

CONTROLE	FRATURAS	OA1	OA2	OA3	OC
169,20	49,06	140,85	12,15	61,69	75,04
131,18	62,15	48,96	121,95	20,90	74,25
291.15	46.31	34.16	161.10	81.45	455.18
72.23	97.57	101.02	11,70	5,18	218,70
111.83	113,63	101,22	133,88	28,80	231,30
290,03	57,53	34,78	36,23	71,10	313,43
524,48	49,83	28,26	96.08	62,93	99.67
364,05	60,17	114,99	58,68	59,51	368,55
176.18	49.83	160.22	107.09		423,45
29.93	90,31	49,89	171.09		116,44
414,90	39,93	14,49	217,58		97.19
261,23	53,57	173,16	181.02		106.09
343,35	58,63	,	14,49		325,80
35,10	52,91		,		194,99
340,43	65,34				76,90
417,83	105,38				20,80
248,32	41,80				41,81
149.53	102.74				160.53
37.38	28.71				38.25
	25.52				131.45
	70.51				231.75
	127.27				24.84
	219.67				169.53
	140.03				153.80
	,				80.54
					160.93
					219.36
					138.96
					63.20
					61.97
					157.79
					277,37
					75.21
					250,75
					92.96
					257.85
					262.22
					206.93
					195.60
					115.21
					182.09
					69,34
					74.39
					203,52
					196,29
					277,64
					197,52
					26,07
					220,31
					113,43
					235,74
					234,51
					42,72
					109,75
					116,03

						161,48
						275,32
						187,69
						143,05
						154,25
						135,68
						246,38
						145,37
						148,17
						147,73
						140,80
						198,66
						148,61
						166,65
						117,59
						99,11
						76,89
						94,93
						48,62
						169,84
						119,02
						200,53
						227,70
						0,00
						0,00
						0,00
						0,00
Mediana	248,32	59,40	75,45	107,09	60,60	151,2055
Média	232,01	75,35	83,50	101,77	48,95	153,90
DP	146,17	43,50	55,41	70,37	27,06	93,28
EP	33,53	8,88	16,00	19,52	9,57	10,56

APÊNDICE H

Mediana, média, desvio padrão e erro padrão da concentração de CS ($\mu g/ml$) do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.

CONTROLE	FRATURAS	OA1	OA2	OA3	OC
38,30	25,95	30,25	42,61	16,28	39,74
17.08	84,26	57,51	42,70	20,81	10,61
84.21	90.75	24.61	35.14	20.58	53.35
56,32	45,23	10,12	79.37	84,62	46,38
34.53	51.53	68.66	28.52	65.85	13.87
47.69	29.52	32.45	22.29	78.19	25.95
57.29	20.43	94.66	27.98	51.65	39.58
21.96	22.91	34.37	87.76	25.74	17.02
30.54	16.67	34.42	64.48	69.79	32.96
30.93	18.81	29.30	43.59	52.04	36.37
56.83	15.07	28.69	25.48	34.66	84.54
66.10	15.00	6.88	28.63	22.17	41.94
47.69	16.33	137.73	28.69	30.01	18.14
57.29	22,61	34.77	44.33		41.07
78,77	22.09	43.17	32.04		32.61
58.86	23.75	48.45	23.95		23.21
49.69	97.15	,	,		69.38
47.87	29.12				20.90
61.65	25.85				12.18
34.55	32.04				29.22
76.13	34 77				27.60
34.36	23.95				30.86
27.29	34.66				53.38
63 47	29.22				64 42
56.87	60.35				37.12
66 71	49.04				37,67
21 49	58 59				44 30
53.42	26.38				39.02
35.86	19.53				17.44
71.44	16.60				39.92
49.10	24.34				56.18
24.63	40.70				16.13
37.08	34.16				39.28
35.55	64.96				85.28
19.20	48.80				48.59
42.84	42.38				24.60
44 42	38.84				40.75
49.62	252.80				66.06
27.67	263.16				47.57
22.02	33.62				30.35
31.06	38.45				34.05
23.39	28.89				43.98
35.45	63.15				52.56
25.58	26.41				62.10
20,00	20.25				49.98
	35.70				60.10
	61.34				57.99
	28,89				57.97
	33.72				52.67
	36.23				48.84
	35,75				66.22
	,				36.07
					50.68
					74.07
					39,02

						28,63
						37,06
						45,05
						46,23
						37,87
						37,75
						31,80
						36,94
						28,40
						101,75
						83,49
						24,77
						58,63
						47,68
						83,48
						27,31
						26,89
						11,64
						12,92
						41,82
						16,92
						28,96
						52,44
						28,28
						66,21
						57,06
Mediana	43,63	33,62	34,39	33,59	34,66	39,58
Media	44,38	45,31	44,75	41,10	44,03	42,24
DP	17,49	47,33	32,76	19,76	24,21	19,09
EP	2,64	6,63	8,19	4,94	6,71	1,55

APÊNDICE I

Mediana, média, desvio padrão e erro padrão da concentração de AS ($\mu g/ml$) do LS coletado das articulações dos grupos Controle (C), Fratura (F), OA1, OA2, OA3 e OC – São Paulo – 2018.

CONTROLE	FRATURAS	OA1	OA2	OA3	OC
451,94	427,19	500,47	1261,17	589,06	251,29
587,61	698,24	329,63	809,70	452,91	234,89
751.89	557.58	453.48	365.32	309.21	523.21
216,27	353,24	487.89	825,28	347,20	533,86
431.64	332.81	366.43	251.19	883.39	442.30
234,29	236,89	489,79	285,42	324,56	427,19
328.86	505.91	231.56	626,90	126,42	445.88
314.52	300.81	282.24	311.52	410.79	570.53
294.47	221.36	236.98	285.93	589.54	129.03
338.32	278.78	420.57	310.25	486.15	589.54
270.62	563.08	427.53	242.94	334.00	670.38
332.76	653.83	765.66	278.57	255.47	424.61
234.29	617.54	424.48	427.53	370.18	715.45
328.86	731.52	309.79	618.11	2.0,20	428.17
324.59	587.00	326.05	357.99		367.27
409.57	585.75	294.50	314.90		461.69
317.79	431.78	_> 1,0 0	011,50		947.75
295 73	262.68				301 51
229.65	404 95				463.12
384.86	357.99				241.62
165 35	309.79				315.62
377 44	314 90				331 54
369.60	334.00				386.21
442 52	251 29				293.00
310.96	464 38				295.49
/87 78	311.60				332.70
677.14	326.42				403.06
924.05	/96.31				403,00
395.00	410.06				363 70
585 71	333.00				363.94
452.47	258.90				284.88
456,17	295.85				318 25
410.11	352.16				211.36
306.06	631.04				411.41
408.82	471.20				352 52
400,02	360.26				305.00
4/1,02	503.67				395,09
401,39	285.57				281 25
677.00	205,54				261,25
252.52	120.68				237,09
532,55	439,08				271.07
322,00	4/1,40				271,07
596,07	321,38				227,23
251.27	495,07				215,11
351,27	080,00				5/3,48
	3/3,88				581,10
	357,48				40/,8/
	410,28				4/0,30
	455,15				290,93
	186,91				3/3,48
	558,11				300,58
	454,76				394,72
					336,56
					318,16
					49/,8/
					335,45

						274,24
						258,50
						232,36
						369,69
						283,89
						274,34
						217,31
						237,06
						280,13
						338,51
						394,50
						239,37
						223,44
						269,57
						240,42
						275,67
						722,70
						692,28
						290,08
						263,11
						245,15
						262,84
						231,34
						293,51
						478,89
						636,88
Mediana	393,10	404,95	393,50	336,45	370,18	335,45
Média	411,38	420,27	396,69	473,29	421,45	369,91
DP	147,99	136,15	132,59	284,95	188,72	145,58
EP	22,31	19,07	33,15	71,24	52,34	11,81

APÊNDICE J

Porcentagem do peso molecular do AH do LS coletado das articulações dos grupos Controle - São Paulo - 2018.

0-500 kDa	500-1000 kDa	1000-2000 kDa	>2000 kDa
28	0	0	72
36	0	0	64
52	0	0	48
56	0	0	44
72	0	0	28
36	0	0	64
52	0	0	48
15	0	0	85
10	0	0	90
20	0	0	80
10	0	0	90
10	0	0	90
8	0	0	92
15	0	0	85
15	0	0	85
5	0	0	95
15	0	0	85
20	0	0	80
60	0	0	40
15	0	0	85
20	0	0	80
30	0	0	70
10	0	0	90
20	0	0	80
22	0	0	78
25	0	0	75
35	0	0	65
40	0	0	60
25	0	0	75
50	0	0	50
35	0	0	65
50	0	0	50
25	0	0	75
40	0	0	60
50	0	0	50
30	0	0	70
50	0	0	50
20	0	0	80
40	0	0	60
20	0	0	80
20	0	0	80
50	0	0	50
15	0	0	85
30	0	0	70
60	0	0	40
40	0	0	60
30	0	0	70
80	0	0	20
40	0	0	60

APÊNDICE L

Porcentagem do peso molecular do AH do LS coletado das articulações dos grupos Fraturas - São Paulo - 2018.

31 0 0 69 27 0 0 73 28 0 46 25 64 3 33 0 55 0 0 45 68 0 21 11 39 0 0 61 35 0 0 65 52 0 0 48 38 0 0 62 6 0 0 91 11 0 0 89 4 0 0 96 9 0 0 91 13 0 0 89 62 0 38 0 62 0 38 0 64 94 0 0 0 2 74 24 0 0 30 0 0 70 0 30 0 <th>0-500 kDa</th> <th>500-1000 kDa</th> <th>1000-2000 kDa</th> <th>>2000 kDa</th>	0-500 kDa	500-1000 kDa	1000-2000 kDa	>2000 kDa
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	31	0	0	69
28 0 46 25 64 3 33 0 55 0 0 45 68 0 21 11 39 0 0 61 35 0 0 62 6 0 0 94 38 0 0 62 6 0 0 94 9 0 0 91 11 0 0 89 4 0 0 91 13 0 0 87 11 0 0 89 62 0 38 0 62 0 38 0 63 0 64 0 40 0 0 60 30 0 0 70 5 0 0 95 10 0 0 95 1	27	0	0	73
64 3 33 0 55 0 0 45 68 0 21 11 39 0 0 61 35 0 0 65 52 0 0 48 38 0 0 62 6 0 0 91 11 0 0 89 4 0 0 95 9 0 0 89 62 0 38 0 64 94 0 0 89 62 0 38 0 0 63 94 0 0 0 64 94 0 0 0 64 94 0 0 0 74 24 0 0 0 70 0 0 50 0 70 0 0	28	0	46	25
55 0 0 45 68 0 21 11 39 0 0 61 35 0 0 63 52 0 0 62 6 0 0 94 9 0 0 91 11 0 0 89 4 0 0 91 13 0 0 89 62 0 38 0 62 0 38 0 62 0 38 0 62 0 38 0 63 0 11 0 36 0 64 0 40 0 0 70 50 0 0 70 50 0 0 90 22 74 24 0 93 0 0 <td>64</td> <td>3</td> <td>33</td> <td>0</td>	64	3	33	0
68 0 21 11 39 0 0 61 35 0 0 65 52 0 0 48 38 0 0 62 6 0 0 94 9 0 0 91 11 0 0 89 4 0 0 96 9 0 0 89 4 0 0 87 11 0 0 89 62 0 38 0 6 94 0 0 2 74 24 0 36 0 64 0 40 0 0 50 20 0 0 50 20 0 0 95 5 0 0 95 5 0 0	55	0	0	45
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	68	0	21	11
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	39	0	0	61
52 0 0 48 33 0 0 62 6 0 0 94 9 0 0 91 11 0 0 96 9 0 0 91 13 0 0 89 62 0 38 0 62 0 38 0 62 0 38 0 62 0 38 0 62 0 38 0 63 0 64 0 9 0 11 0 36 0 60 30 9 0 0 60 30 0 0 80 0 5 0 0 95 10 0 0 95 10 0 0 75 10 20 0 75<	35	0	0	65
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	52	0	0	48
6 0 0 94 9 0 0 91 11 0 0 89 4 0 0 96 9 0 0 87 11 0 0 89 62 0 38 0 6 94 0 0 2 74 24 0 89 0 11 0 60 36 0 64 0 40 0 0 60 30 0 0 70 50 0 0 80 0 55 0 45 5 0 0 95 10 0 0 90 25 0 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 5 0 0 85	38	0	0	62
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	6	0	0	94
11 0 0 89 4 0 0 96 9 0 0 91 13 0 0 87 11 0 0 89 62 0 38 0 6 94 0 0 2 74 24 0 89 0 11 0 36 0 64 0 40 0 0 60 30 0 0 70 50 0 0 80 0 55 0 45 5 0 0 95 10 0 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 15 0 0 95 <t< td=""><td>9</td><td>0</td><td>0</td><td>91</td></t<>	9	0	0	91
4 0 0 96 9 0 0 91 13 0 0 87 11 0 0 89 62 0 38 0 6 94 0 0 2 74 24 0 89 0 11 0 36 36 0 64 0 0 30 0 0 60 30 30 0 0 880 0 50 0 0 95 5 5 0 0 95 5 10 0 0 90 95 5 0 0 75 10 25 0 0 75 10 25 0 0 75 10 30 0 70 0 15 30 0 70 0 <td>11</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>89</td>	11	0	0	89
9 0 0 91 13 0 0 87 11 0 0 89 62 0 38 0 6 94 0 0 2 74 24 0 89 0 11 0 36 0 64 0 400 0 0 60 30 0 0 70 50 0 0 80 0 55 0 45 5 0 0 95 5 0 0 95 5 0 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 5 0 0 95 5 0 0 95 10 20 0 75 25 0 0 95 5	4	0	0	96
13 0 0 87 11 0 0 89 62 0 38 0 6 94 0 0 2 74 24 0 89 0 11 0 36 0 64 0 40 0 0 60 30 0 0 50 20 0 0 80 0 55 0 45 5 0 0 95 10 0 0 90 25 0 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 0 95 1 30 0 70 0 25 0 0 95	9	0	0	91
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	13	0	0	87
62 0 38 0 6 94 0 0 2 74 24 0 89 0 11 0 36 0 64 0 40 0 0 60 30 0 0 50 20 0 0 80 0 55 0 45 5 0 0 95 5 0 0 95 5 0 0 95 10 0 0 95 10 20 0 75 10 20 0 75 335 0 0 75 30 0 70 0 55 0 0 95 10 20 0 0 75 20 </td <td>11</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>89</td>	11	0	0	89
6 94 0 0 2 74 24 0 89 0 11 0 36 0 64 0 40 0 0 60 30 0 0 70 50 0 0 50 20 0 0 80 0 55 0 45 5 0 0 95 5 0 0 95 10 0 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 0 75 0 0 25 0 0 75 10 0 75 0 0 25 0 0 75 20 <td>62</td> <td>0</td> <td>38</td> <td>0</td>	62	0	38	0
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	6	94	0	0
89 0 11 0 36 0 64 0 40 0 0 60 30 0 0 70 50 0 0 50 20 0 0 80 0 55 0 45 5 0 0 95 5 0 0 95 10 0 0 90 25 0 0 75 10 20 0 75 25 0 0 75 10 20 0 70 330 0 70 0 25 0 0 75 5 0 0 95 15 0 0 95 5 0 0 75 20 0 <td>2</td> <td>74</td> <td>24</td> <td>0</td>	2	74	24	0
36 0 64 0 40 0 0 60 30 0 0 70 50 0 0 50 20 0 0 80 0 55 0 45 5 0 0 95 5 0 0 95 5 0 0 95 10 0 0 95 10 20 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 30 0 70 0 25 0 0 85 30 0 75 20 0 0 80 25 0 0	89	0	11	0
40 0 0 60 30 0 0 70 50 0 0 50 20 0 0 80 0 55 0 45 5 0 0 95 5 0 0 95 10 0 0 95 10 0 0 75 25 0 0 75 10 20 0 70 35 0 0 75 10 20 0 70 35 0 0 75 5 0 0 75 5 0 0 95 15 0 0 85 30 0 75 5 0 0 80 25 0 0	36	0	64	0
10 0 0 70 50 0 0 50 20 0 0 80 0 55 0 45 5 0 0 95 5 0 0 95 10 0 0 95 10 0 0 75 25 0 0 75 25 0 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 20 0 75 10 20 0 70 25 0 0 75 5 0 0 85 30 0 70 95 5 0 0 75 20 0 0 80 20 0 <	40	0	0	60
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	30	0	0	70
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	50	0	0	50
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	20	0	0	80
5 0 0 95 5 0 0 95 10 0 0 90 25 0 0 75 25 0 0 75 10 20 0 75 10 20 0 70 35 0 0 65 50 0 0 50 30 0 70 0 25 0 0 75 5 0 0 85 30 0 70 0 25 0 0 85 30 0 70 0 5 0 0 80 20 0 0 80 25 0 0 80 20 0 0 80 20 0 <td>0</td> <td>55</td> <td>0</td> <td>45</td>	0	55	0	45
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	5	0	0	95
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	5	0	0	95
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	10	0	0	90
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	25	0	0	75
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	25	0	0	75
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	10	20	0	70
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	35	0	0	65
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	50	0	0	50
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	30	0	70	0
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		0	0	75
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	5	0	0	95
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	15	0	0	85
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	30	0	70	0
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	5	0	0	95
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	20	0	0	80
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	20	0	0	75
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	20	0	0	80
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	20	0	0	75
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	20	0	0	80
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	20	0	0	80
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	20	0	0	65
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	55	0	0	05
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	5	0	0	05
5 0 0 95	5	0	0	95
	5	0	0	95

APÊNDICE M

0-500 kDa	500-1000 kDa	1000-2000 kDa	>2000 kDa
27	0	0	73
48	0	52	0
13	0	0	87
20	0	0	80
7	0	0	93
48	0	0	52
49	0	51	0
29	0	0	71
55	0	16	29
20	0	0	80
44	0	40	16
13	0	0	87
42	0	58	0
34	0	66	0
45	40	15	0
35	0	0	65
35	0	0	65

Porcentagem do peso molecular do AH do LS coletado das articulações dos grupos OA1 - São Paulo - 2018.

Porcentagem do peso molecular do AH do LS coletado das articulações dos grupos OA2 - São Paulo - 2018.

0-500 kDa	500-1000 kDa	1000-2000 kDa	>2000 kDa
53	0	0	47
12	0	0	88
42	0	0	58
14	35	0	51
35	0	0	65
37	0	0	63
66	0	11	23
48	0	0	52
56	0	44	0
11	58	32	0
6	0	0	94
15	85	0	0

Porcentagem do peso molecular do AH do LS coletado das articulações dos grupos OA3 - São Paulo - 2018.

0-500 kDa	500-1000 kDa	1000-2000 kDa	>2000 kDa
21	0	0	79
14	0	0	86
28	0	0	72
77	0	0	33
18	0	0	62
68	0	28	4
77	0	0	23
10	42	48	0
48	0	52	0
31	69	0	0
20	0	80	0
46	0	54	0

APÊNDICE N

Porcentagem do peso molecular do AH do LS coletado das articulações dos grupos OC - São Paulo - 2018.

0-500 kDa	500-1000 kDa	1000-2000 kDa	>2000 kDa
57	0	0	43
56	0	0	44
46	0	0	54
65	0	0	35
18	0	0	82
46	0	0	54
33	0	0	67
63	0	0	37
12	0	0	88
19	0	0	81
28	36	0	36
4	0	0	96
17	0	0	83
15	0	0	85
20	0	0	80
6	0	0	94
90	0	0	10
10	0	0	90
50	0	0	50
15	0	0	85
35	0	0	65
18	0	0	82
29	0	8	63
67	0	0	33
76	0	0	24
11	0	0	89
9	0	0	91
8	0	0	92
13	0	0	87
12	0	7	81
41	0	0	59
35	0	0	65
10	0	0	90
8	0	0	92
51	0	49	0
81	0	19	0
/3	0	25	0
81	0	19	0
78	0	0	22
79	0	0	21
60	0	21	40
37	0	0	40 63
37	0	0	56
44	0	0	52
40	0	0	01
36	0	0	6/
46	0	0	5/
15	34	0	51
2	0	79	19
7	0	0	93
19	0	41	40
5	0	95	0
7	0	15	78
10	0	26	64
16	0	0	84

15	0	0	85
31	0	0	69
56	0	0	44
63	0	0	37
73	0	0	27
43	0	0	57
16	0	0	84
40	0	0	60
43	0	0	57
44	0	0	56
75	0	8	17
42	0	0	58
45	0	0	55
10	0	0	90
5	0	95	0
85	0	15	0
47	53	0	0
49	51	0	0
29	71	0	0
51	49	0	0
35	0	65	0
50	0	50	0
25	33	42	0