

Sérgio da Silva Rocha Junior

**CARTOGENINA ASSOCIADA À MICROPERFURAÇÃO DO OSSO
SUBCONDRA NA REPARAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR EM
EQUINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Prof. Rafael Resende Faleiros.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2015

R672c Rocha Junior, Sérgio da Silva, 1985-
Cartogenina associada à microperfuração do osso subcondral na reparação da cartilagem articular em equinos / Sérgio da Silva Rocha Junior. – 2015.
47 p. : il.

Orientador: Rafael Resende Faleiros
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Equino – Cirurgia – Teses. 2. Articulações – Doenças – Teses. 3. Osteoartrite – Teses.
4. Cartilagem articular – Teses. 5. Artroscopia veterinária – Teses. I. Faleiros, Rafael Resende. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

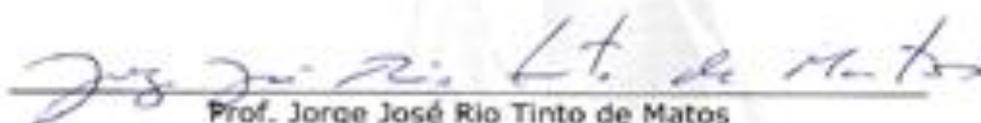
SÉRGIO DA SILVA ROCHA JÚNIOR

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.

Aprovada em 09 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Rafael Resende Faleiros
Presidente - Orientador



Prof. Jorge José Rio Tinto de Matos
PUC- MINAS

Prof^o. Fabiola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária-UFMG



Prof. Jairo Jaramillo Cárdenas
Instituto Brasileiro de Veterinária - IBVET

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais pelo amor, apoio e ensinamentos e minha noiva Sabrina por existir na minha vida.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Deus pela tua grandeza, pelo seu amor incondicional. Obrigado pelo carinho e cuidado com minha família.

Ao Dr. Rafael Resende Faleiros pela orientação, oportunidade e ensinamentos de vida e clínica e cirurgia que levarei por toda minha vida profissional.

Aos meus irmãos (Marcus e Matheus) sempre presentes, mesmo que distantes.

Aos Professores Fabíola de Oliveira Paes Leme e Jairo Jaramillo Cárdenas por aceitarem fazer parte da comissão examinadora.

À professora Suzane Lilian Beier pela realização nas anestésias dos animais.

À professora Eliane Gonçalves de Melo por toda ajuda com a metodologia do trabalho.

Aos bolsistas Davi e Isabela pela ajuda que deram no cuidado dos animais.

Aos colegas e amigos da pós-graduação: Cahuê Paz, Rodrigo Ribeiro, Rodrigo Valadares, Odael Spadeto, Jéssica Fontana.

À Débora por toda ajuda com as análises de líquido sinovial.

À Heloísa Falcão por todo processamento e análise histológica.

Aos residentes do Hospital Veterinário da UFMG: Mayara, Jerusa, Marcus e Duda, agradeço toda contribuição que deram neste experimento.

Ao auxiliar de enfermagem do Hospital Veterinário da UFMG: Carlos (Carlão).

Aos animais que permitiram a execução deste experimento: Tetinha, Julinha, Sabrina, Mariana, Clotilde e Fumaça, minha eterna gratidão.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

*“Conquistas sem riscos são sonhos sem méritos.
Ninguém é digno dos sonhos se não usar suas derrotas
para cultivá-los”.*

Augusto Cury (1958)

SUMÁRIO

RESUMO	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DA CARTILAGEM ARTICULAR.....	14
3.2. OSTEOARTRITE.....	15
3.3. TERAPÊUTICA DESTINADA AO ESTÍMULO DA REPARAÇÃO ENDÓGENA.....	16
3.4. TÉCNICA DE MICROFRATURA.....	18
3.5. CARTOGENINA COMO MODULADOR DE DIFERENCIAÇÃO DE CONDROCITOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
5. RESULTADOS	26
5.1. INDUÇÃO DE LESÃO E PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO.....	26
5.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E ULTRASSONOGRÁFICA.....	26
5.3. ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL.....	29
5.4. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E REALIZAÇÃO DA BIÓPSIA.....	34
5.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	36
6. DISCUSSÃO	39
6.1. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E ULTRASSONOGRÁFICA.....	39
6.2. MODELO DE LESÃO CONDRAL.....	39
6.3. AVALIAÇÃO DE CLAUDICAÇÃO.....	40
6.4. ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL.....	41
6.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	42
7. CONCLUSÃO	42
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Graduação de claudicação, segundo a Associação Americana de Veterinários de Equinos.....	22
Tabela 2 -	Graduação de claudicação, segundo a Associação Americana de Veterinários de Equinos.....	22
Tabela 3 -	Graduação de coágulo de mucina.....	23
Tabela 4 -	Escala radiográfica de lesão articular.....	23
Tabela 5 -	Escala ultrassonográfica de lesão articular.....	23
Tabela 6 -	Graduação do preenchimento da lesão, 60 dias após indução da lesão condral.....	24
Tabela 7 -	Escore de aderência as bordas do tecido de reparação, 60 dias após indução da lesão condral.....	24
Tabela 8 -	Escore de aderência ao osso subcondral do tecido de reparação, 60 dias após indução da lesão condral.....	24
Tabela 9 -	Escore de presença de irregularidade no tecido de reparação, 60 dias após indução da lesão condral.....	25
Tabela 10 -	Escore de presença de fibrilações do tecido de reparação, 60 dias após indução da lesão condral.....	25
Tabela 11 -	Escore da presença de erosões no tecido e ao redor da lesão condral, 60 dias após indução da lesão condral.....	25
Tabela 12 -	Escore de presença de sinovite, 60 dias após indução da lesão condral.....	25
Tabela 13 -	Porcentual de cartilagem hialina.....	25
Tabela 14 -	Escore de proporção de cartilagem hialina de acordo com a porcentagem de sua presença no tecido de reparo.....	25
Tabela 15 -	Medias e desvios-padrão das variáveis do tecido de reparação, durante a avaliação videoartroscópica no tempo – 60 da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.....	34
Tabela 16 -	Ocorrência de proliferações no tecido cicatricial.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Padronização do diâmetro lesão condral na tróclea lateral distal T-0, abertura da pinça de Ferris Smith sobre a lesão.....	21
Figura 2 -	Médias e erros-padrão da avaliação de claudicação segundo AAEP ou metodologia própria de equinos submetidos à lesão condral na tróclea lateral do fêmur, tratados ou não com cartogenina.....	26
Figura 3 -	Imagem radiográfica de exposição lateromedial oblíqua da articulação femurotibiopatelar de equinos submetidos a lesão condral e tratados com microperfurações subcondrais, 30 dias após indução da lesão. As setas mostram os pontos de perfuração no osso subcondral da tróclea lateral.....	27
Figura 4 -	Imagem ultrassonográfica cranial da tróclea lateral na segunda semana pós operatório de equinos submetidos a lesão condral e tratados com microperfurações subcondrais. As setas indicam os pontos de perfuração realizados no osso subcondral.....	28
Figura 5 -	Mensuração da circunferência e área do recesso femuropatelar medial da articulação femuropatelar direita, setas amarelas indicam proliferações sinoviais (A). Mensuração da circunferência e área do recesso lateral da articulação femuropatelar direita (B).....	28
Figura 6 -	Médias e erros-padrão da circunferência e área do recesso femuropatelar medial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral na tróclea lateral do fêmur, tratados ou não com cartogenina.....	29
Figura 7 -	Médias e erros-padrão da circunferência e da área do recesso lateral da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral na tróclea lateral do fêmur, tratados ou não com cartogenina.....	29
Figura 8 -	Médias e erros-padrão dos graus de coagulação de mucina do líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.....	30
Figura 9 -	Médias e erros-padrão da concentração de proteínas no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.....	30
Figura 10 -	Médias e erros-padrão do fibrinogênio no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.....	31
Figura 11 -	Médias e erros-padrão dos valores de Ph no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.....	31

Figura 12 - Médias e erros-padrão dos valores de hemácias no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.....	32
Figura 13 - Médias e erros-padrão de leucócitos no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.....	32
Figura 14 - Médias e erros padrão de segmentados no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.....	33
Figura 15 - Médias e desvios-padrão de células mononucleares no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea do fêmur tratados ou não com cartogenina.....	33
Figura 16 - Avaliação das características macroscópicas T-60, articulação controle (A) e articulação tratada (B). Setas amarelas indicam presença de erosões levando aumento do diâmetro da lesão. Setas pretas indicam áreas de preenchimento incompleto sobre o defeito condral.....	34
Figura 17 - Imagem artroscópica da articulação femuropatelar tratada com cartogenina, setas indicam intensas proliferações do tecido de reparação.....	35
Figura 18 - Artrotomia realizada sobre a tróclea lateral, setas indicam o tecido de reparação neoformado (A). Posicionamento do lamelótomo de Falcão Faleiros, para realização da biópsia (B). Amostra do tecido após fixação com formalina 10% (C).....	36
Figura 19 - Fotomicrografia do tecido de reparação, T-60. Observa-se predomínio de fibras colágenas desorganizadas e células fibroblastóides (H&E, Objetiva: 10x).....	37
Figura 20 - Fotomicrografia do tecido de reparação, T-60. Observa-se entre setas negras a presença de matriz colágena bem organizada, com presença de condrócitos (setas amarelas), com características de cartilagem hialina (H&E, Objetiva: 20x).....	37
Figura 21 - Fotomicrografia do tecido de reparação, T-60. Apresenta fraca coloração na matriz territorial e interterritorial, (1) região com fibras desorganizadas, (2) matriz colágena com características de cartilagem hialina (Azul de toluidina, Objetiva 20x).....	38
Figura 22 - Fotomicrografia de luz polarizada, T-60. Apresenta predomínio de fibras colágenas de coloração amarelo e vermelho (colágeno tipo I) (Picosírius red, Objetiva: 10x).....	38

Figura 23 - Médias e desvios-padrão da formação de cartilagem hialina na articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina..... 39

RESUMO

A reconstrução da cartilagem articular danificada por doenças de desenvolvimento, trauma e osteoartrite tem sido um grande desafio tanto na Medicina quanto na Veterinária. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico da cartogenina associada à técnica de microfratura na reparação de defeitos condrais induzidos. Foram utilizados seis equinos pesando em média (\pm DP) $342 \pm 1,58$ kg, com a idade aproximada de $7,2 \pm 1,30$ anos e escore corporal de $7,1 \pm 0,75$, que foram submetidos a videoartroscopia para indução da lesão condral de 1 cm^2 na tróclea lateral do fêmur e realização da técnica de microperfuração do osso subcondral de ambos os joelhos. Foram realizadas quatro aplicações semanais com $20 \mu\text{M}$ de cartogenina intra-articulares em um dos joelhos (grupo tratado) e solução de ringer com lactato na articulação contralateral (grupo controle). Os animais foram submetidos a análises física, do líquido sinovial, radiográfica e ultrassonográfica por um período de 60 dias, sendo, ao final, submetidos novamente a videoartroscopia para avaliação do processo de reparação e realização da biópsia. As análises histológicas revelaram tecido de reparação com predomínio de fibrocartilagem, mas contendo, em média, 17% de cartilagem hialina. Entretanto, não houve qualquer diferença clínica ou histológica entre as articulações tratadas e controles. A terapia com cartogenina, segundo protocolo utilizado, não produziu melhora clínica ou foi eficaz em melhorar a qualidade ou a quantidade de tecido de reparação em lesões osteocondrais induzidas e tratadas com microperfurações na tróclea lateral do fêmur em equinos.

Palavras-chave: Cartilagem hialina, osteoartrite, videoartroscopia, cavalo.

ABSTRACT

The reconstruction of the articular cartilage damaged by development diseases, trauma and osteoarthritis has been a great challenge both in Medicine and in Veterinary. The objective of this study was to evaluate the therapeutic potential of kartogenin associated with subchondral micro-perforations in the repair of induced chondral defects. Six horses with a mean (\pm SD) weight of 342 ± 1.58 , aging 7.2 ± 1.30 years and with a mean 7.1 ± 0.75 body score condition were used. By arthroscopy, a one cm^2 -chondral defect was induced in the lateral femoral trochlea followed by treatment with subchondral micro-perforation in both stifles. Four intra-articular weekly injections with kartogenin (20 mM) were performed in one knee (treated group), and the same procedure with Ringer lactate solution was performed in the contralateral joint (control group). Clinical, synovial fluid, ultrasonography and radiographic exams were performed for a period of 60 days and, at the end, a new arthroscopy was done to evaluate the repair process and to collect biopsy samples. Histological analysis showed a repair tissue mostly formed by fibrocartilage but with a mean percentage of 17.5% of hyaline cartilage. However, no statistical difference were detected among treated and control groups. The kartogenin therapy, according to the used protocol, did not promote any clinical benefit and was not effective in improving the quality or quantity of repair tissue in a model of equine femoral trochlea chondral defect treated with osteochondral micro-perforations.

Keywords: Hyaline cartilage, osteoarthritis, videoarthroscopy, horse.

1. INTRODUÇÃO

A reconstrução da cartilagem articular danificada por doenças de desenvolvimento, trauma e osteoartrite tem sido um grande desafio tanto na Medicina quanto na Veterinária. Dentre as enfermidades articulares dos equinos, a osteoartrite (OA) é a mais frequente, correspondendo a 60 % das causas (McIlwraith, 1996; Sandoval, 2007). Sendo primeiramente relatada em 1938 como doença articular degenerativa (Kelsner e Callender, 1938). A OA é definida como um processo crônico caracterizado por progressiva deterioração da cartilagem articular acompanhado por alterações na capsula articular, osso subcondral e demais tecidos articulares (Palmer e Bertone, 1994; McIlwraith, 1996; Brandt et al., 2009). A principal consequência da OA é a degradação da cartilagem articular e essa apresenta limitações quanto a seu potencial de regeneração. Isso ocorre devido a particularidades em seu metabolismo, dentre eles o baixo potencial mitótico dos condrócitos o qual é responsável pela produção da matriz extracelular (colágeno tipo II) e proteoglicanos (Hurtig et al., 1988).

Diversos tratamentos são propostos para terapia da OA, dentre eles os mais comuns são o uso de anti-inflamatório não esteroides (AINEs), ácido hialurônico, glicosaminoglicana polissulfatada e anti-inflamatórios esteroides administrados intra-articular (McIlwraith, 2005; Getgood et al., 2009). No entanto, o tratamento da OA é sintomático, atuando principalmente na diminuição da dor e inflamação, impedindo a progressão da doença, mas estes medicamentos podem levar a efeitos adversos, dentre eles, transtornos gastrointestinais, dano renal e imunossupressão (Clegg e Booth, 2000; Sandoval et al., 2013).

Uma vez degradada a cartilagem articular, esta não possui a capacidade de autorregeneração, e nos casos onde houve perda de cartilagem com exposição osso subcondral, ocorrerá a formação de um tecido cicatricial fibroso, podendo ou não sofrer metaplasia para fibrocartilagem (Hurtig et al., 1988). Para contornar o potencial limitado de regeneração houve estímulo a pesquisas utilizando a medicina regenerativa, como o plasma rico em plaquetas e células tronco mesenquimais e mesmo com estes avanços o resultado alcançado é a fibrocartilagem e não cartilagem hialina (Milano et al., 2010 ; McIlwraith et al., 2011; Yamada, et al., 2011; Milano et al., 2012).

No entanto uma molécula denominada cartogenina vem sendo estudada, a qual tem a capacidade de diferenciar células tronco mesenquimais em condrócitos (Johnson et al., 2012), e tem apresentado resultados promissores em animais de laboratório (Johnson et al., 2012; X.Xu et al., 2014).

Devido ao potencial desta molécula e ainda não existirem pesquisas utilizando equinos como animais de experimentação, foi associada a técnica de microperfuração do osso subcondral à infusão de cartogenina intra-articular, em defeitos condrais induzidos na tróclea lateral do fêmur, para posterior avaliação do processo de reparação.

2. OBJETIVOS

Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo avaliar a reparação da cartilagem hialina equina, por meio de videoartroscopia e histologia, em defeitos condrais induzidos e tratados pela técnica de microperfuração subcondral associada ou não com administração intra-articular de cartogenina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DA CARTILAGEM ARTICULAR

Uma articulação sinovial ou diartrodial consiste em epífises ósseas cobertas por cartilagem do tipo hialina, unidas por ligamentos e cápsula articular formando uma cavidade, onde está preenchida por líquido sinovial (McIlwraith, 2006).

Dentre suas funções, a cartilagem articular tem um papel importante na absorção e transferência de cargas, devido sua composição predominantemente por colágeno e proteoglicanos, que formam uma matriz de superfície lisa resistente a compressão. Esta superfície é banhada pelo líquido sinovial que dentre seus componentes, o ácido hialurônico fornece a viscosidade o que reduz o atrito entre as superfícies articulares (Caron, 2010).

A cartilagem articular é do tipo hialina, composta basicamente por água (75%), colágeno tipo II (15%), proteoglicanos (10%) e uma pequena parcela de condrócitos (2%) (Poole, 2001; Caron, 2010). É desprovida tanto de nervos quanto de vasos sanguíneos e linfáticos, recebendo nutrição por meio do fluido sinovial (Getgood et al., 2009; Caron, 2010). É um tecido que não possui células imunológicas, mas, como defesa, os condrócitos secretam lisozima para neutralizar microrganismos (Getgood et al., 2009).

A cartilagem articular é dividida em quatro camadas, sendo que em cada uma os condrócitos possuem aspectos morfológicos diferentes. Na camada superficial ou tangencial os condrócitos possuem formato ovóide e fibras colágenas orientadas tangencialmente, já na camada de transição ou intermediária estas células podem estar pareadas ou sozinhas e as fibras colágenas possuem uma orientação aleatória, a camada profunda ou radiada possui condrócitos arranjados em colunas verticais onde são separados por fibras colágenas em um arranjo radial, por último a camada calcificada é composta por cartilagem mineralizada e condrócitos em estágios diferentes de degeneração (McIlwraith, 2006; Caron, 2010).

Os condrócitos são células de forma esférica, rodeados por lacunas, responsáveis pela produção da matriz extracelular, que é composta predominantemente por fibras de colágeno do tipo II, mas também é constituída por colágenos dos tipos VI, IX, e XI com pelo tipo X no plano calcificado (Getgood et al., 2009; McIlwraith, 2006; Nixon, 1991). Os condrócitos secretam lubrificina, também conhecida como proteína da zona superficial, uma molécula responsável para redução do coeficiente de fricção (Getgood et al., 2009).

Entre os espaços formados através das ligações das fibras de colágeno existem moléculas hidrofílicas de proteoglicanos, principalmente agregan e ácido hialurônico (McIlwraith, 2006). Estas moléculas são carregadas negativamente e têm como função atrair água para o tecido fornecendo, dessa forma, rigidez à compressão (McIlwraith, 2006; Getgood et al., 2009). A cartilagem articular possui também glicoproteínas como a fibronectina e a proteína oligomérica da cartilagem que têm um papel de adesão. Além disso, existem fatores de crescimento presentes, tais como a proteína óssea morfogenética, a qual está sob intensa investigação, mas permanece pouco compreendida (Getgood et al., 2009).

O tecido cartilaginoso normal se encontra constantemente em renovação, em uma atividade regulada por um equilíbrio entre várias enzimas como as metaloproteinases de matriz (MMP) do

tipo 3, 8, 9 e 3, agreganases 4 e 5 predominantes e de enzimas inibidoras teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Murphy, 2005).

Dentre as particularidades da cartilagem articular, uma delas é o potencial limitado de regeneração e cicatrização. Isto ocorre devido ao potencial mitótico limitado dos condrócitos e produção ineficaz de colágeno e proteoglicanos (reparo intrínseco). O mecanismo de reparação extrínseco é através de células mesenquimais oriundas do osso subcondral que participam na formação de um novo tecido conjuntivo que pode vir sofrer metaplasia e diferenciar em componentes da cartilagem hialina. Por último um terceiro fenômeno, conhecido como “fluxo de matriz”, neste caso pode ocorrer a formação de cartilagem hialina nas bordas do tecido de reparação e migração para o centro da lesão (Hurtig, 1988).

3.2. OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é o tipo mais comum de artrite em seres humanos e animais, sendo a mais frequente em cães e equinos. Na espécie equina, está diretamente associada à perda de desempenho atlético e à aposentadoria precoce de atletas (Sutton et al., 2009). A OA pode ser caracterizada por deterioração progressiva da cartilagem articular, acompanhada por alterações no osso subcondral, ligamentos, cápsula, membrana sinovial, e músculos periarticulares (McIlwraith, 2005; Brandt et al., 2009).

Sua origem é multifatorial, podendo ser desencadeada através do trauma sobre a cartilagem, a cápsula articular e o osso subcondral (McIlwraith, 2005), além disso possui caráter genético, de desenvolvimento e metabólico (Brandt et al., 2009). Em situações em que forças biomecânicas cíclicas agem de forma desequilibrada sobre a cartilagem articular, pode haver fratura da mesma, induzindo uma resposta inflamatória e conseqüente liberação de citocinas. Além do trauma, processos inflamatórios envolvendo a cápsula articular e a membrana sinovial desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios que vão atuar diretamente sobre a cartilagem. Este processo inflamatório induz aumento da permeabilidade capilar, promovendo o surgimento de efusão do líquido sinovial, induzindo dor articular e perda de mobilidade (McIlwraith, 2005). Outra estrutura de grande importância na AO é o osso subcondral que, quando lesionado por processos traumáticos ou inflamatórios, acarreta em lesão secundária da cartilagem devido à falta de suporte ósseo com liberação de citocinas inflamatórias (Lajeunesse & Reboul, 2000; McIlwraith, 2005).

Os mediadores inflamatórios envolvidos no processo incluem a interleucina 1 (IL1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e óxido nítrico (Blanco et al., 1998; Kim et al., 2003). A IL1 e o TNF α modulam a síntese das metaloproteinases pelos condrócitos e sinoviócitos (McIlwraith^a, 2005). Dentre as metaloproteinases envolvidas na patogênese da OA, incluem as collagenases, as gelatinases, a estromelisina e as desintegrinas e metaloproteinases (ADAMs) (Goldring, 2000). Dentre as collagenases, a MMP1, a MMP8 e a MMP13 estão envolvidas no processo de degradação do colágeno tipo II da cartilagem articular. Já a estromelisina, também conhecida como agreganase ou MMP3, causa degeneração dos proteoglicanos (McIlwraith, 2005).

Tanto a IL1 e quanto o TNF α , além de modularem a síntese das MMPs, induzem a produção de prostaglandina E2 (PGE₂) por meio dos condrócitos, promovendo decréscimo de proteoglicanos na matriz extracelular. Já o óxido nítrico e o ânion superóxido, que são liberados devido ao dano nos tecidos articulares, causam degradação de cadeias de colágeno e proteoglicanos (McIlwraith, 2005).

Desencadeado todo o processo inflamatório, ocorrerá a degradação da matriz extracelular, onde nos estágios iniciais da doença, ocorrerá o amolecimento da cartilagem articular, levando ao surgimento de fibrilações. Com a progressão do processo inflamatório as lesões iniciais evoluirão para a formação de úlceras e consequente perda da cartilagem, expondo o osso subcondral, causando esclerose, eburnação e formação de osteófitos e cistos subcondrais (Brandt et al., 2009).

3.3. TERAPÊUTICA DESTINADA AO ESTÍMULO DA REPARAÇÃO ENDÓGENA

Diversos medicamentos são indicados para terapia da osteoartrite, dentre eles o mais comum é uso anti-inflamatórios não esteroides. Os fármacos desta classe tem como objetivo, reduzir os efeitos inflamatórios, dor e diminuir a progressão dos danos nos tecidos articulares (Clegg e Booth, 2000). Outro medicamento amplamente utilizado é o ácido hialurônico, sendo está uma glicosaminoglicana que é um dos componentes da cartilagem articular, líquido e membrana sinovial. O emprego deste medicamento tem como função inibir o efeito inflamatório, reduzindo a migração de mediadores inflamatórios dentre eles as prostaglandinas (Howard e McIlwraith, 1996; Clegg & Booth, 2000), mas também possui efeito protetor da matriz da cartilagem dos efeitos inflamatórios e enzimas degradativas (Clegg e Booth, 2000). Outro medicamento utilizado é a glicosaminoglicana polissulfatada. Seu mecanismo de ação não está bem claro, mas possui efeito anti-inflamatório e tem a capacidade de inibir enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação da matriz extracelular da cartilagem articular (Trotter, 1996; Clegg e Booth, 2000). Além disso, tem sido mostrado que estimula a síntese ácido hialurônico e proteoglicanos endógeno (Clegg e Booth, 2000).

Quanto ao uso de anti-inflamatórios esteroides intra-articular, este é um tanto controverso, devido estudos demonstrarem que altas doses produzem efeitos deletérios na cartilagem articular, além disso, acelera o progresso na osteoartrite (Frisbie et al., 1997). Em doses terapêuticas, apresenta potente efeito anti-inflamatório devido inibição da ciclo oxigenase e lipo oxigenase, sendo indicado para uma única aplicação intra articular ou tratamento a curto prazo devido a seus efeitos adversos (Clegg e Booth, 2000).

Em resumo, os medicamentos utilizados na terapia da osteoartrite têm como principal objetivo, inibir a progressão da doença, redução da dor e melhora da função articular, mas para os casos onde houve a degradação da cartilagem articular ainda não existe um medicamento capaz de induzir a reparação tecidual, contudo terapias visando a reparação articular foram desenvolvidas.

A medicina regenerativa articular tem como principal objetivo restabelecer a estrutura e fisiologia normal da superfície articular. Além disso, recompor todas as estruturas que compõem a articulação, como o osso subcondral, ligamentos, meniscos, membrana sinovial e outras estruturas adjacentes (Fortier e Smith 2008; McIlwraith, 2009).

Para isto, diversos métodos são utilizados na reparação da cartilagem articular. Dentre eles o mais simples é o debridamento do defeito condral, que tem como objetivo a remoção de flaps instáveis de cartilagem ou fragmentos que em alguns casos encontram-se livres na articulação (Hubbard, 1996). Outro método é o transplante osteocondral autólogo, onde é removido um fragmento do joelho ipsilateral de locais onde não a sustentação de peso, como a tróclea lateral e sulco intercondilar e estes são implantados em um furo cilíndrico pré-preparado no local da lesão condral (Hangody et al., 1997; Simon et al., 2001). Outra técnica é o tranplante autólogo

de condrócitos, onde é feito uma biópsia da cartilagem no joelho ipsilateral através de videoártroscopia, em seguida é realizada uma expansão *in vitro* de condrócitos, e em um segundo estágio a expansão é aplicada sobre o defeito condral e recoberto com perisóteo e fixado através de sutura ou cola de fibrina (Brittberg et al., 1994; McIlwraith, 2005). Em casos de defeitos condrais pequenos, outro método, é plug osteocondral sintético, o qual tem como função preencher o defeito condral e serve como arcabouço (Getgood et al., 2009; Elguizaoui et al., 2012).

Nos casos de grandes defeitos condrais, uma opção é o aloenxerto de cartilagem, em seres humanos esta é indicada nos casos de pacientes jovens onde à extensa lesão condral e a prótese não é uma opção viável (Emmerson et al., 2007).

Em relação aos resultados alcançados com estas terapias, o debridamento do defeito condral apenas apresenta benefícios para alívio de sintomas mecânicos, oriundos de fragmentos soltos na articulação (Getgood et al., 2009). Já o transplante osteocondral autólogo apresenta bons resultados. Contudo tem como particularidades a difícil execução da técnica e também pode ocasionar alterações na congruência articular e por último é criado um novo defeito condral na área doadora (Hangody et al., 1997).

O transplante autólogo de condrócitos apresenta bons resultados a curto prazo, sendo que o tecido cicatricial não é cartilagem hialina além disso, para este procedimento são necessários dois tempos cirúrgicos e a cultura celular é onerosa (Getgood et al., 2009). O uso de plug osteocondral a curto prazo demonstra bons resultados quando utilizado em lesões pequenas, produzindo alívio dos sintomas, mas quando utilizado em pacientes ativos e a longo prazo seus resultados ainda apresenta limitações (Joshi et al., 2012). Por último, o aloenxerto demonstra resultados satisfatórios, mas exibe problemas como é descrito nos demais enxertos, como o risco de rejeição, além disso, problemas com a incorporação do enxerto e a viabilidade dos condrócitos e risco de transmissão de doenças (Bugbee e Convery, 1999).

Como foi descrito, nenhum dos tratamentos disponíveis até o momento induz a auto regeneração da cartilagem hialina, por isto é muito discutido o uso da bioengenharia para contornar o potencial limitado de reparação da cartilagem. Devido este fato, houve estímulo a diversas pesquisas utilizando células tronco mesenquimais associadas ou não a plasma rico em plaquetas, mesmo assim o resultado obtido é um tecido cicatricial de baixa qualidade composto por fibrocartilagem (Milano et al., 2010; McIlwraith et al., 2011; Yamada, et al., 2011; Milano et al., 2012).

Uma estratégia menos invasiva e dispendiosa que tem sido amplamente utilizada para melhorar o reparo da cartilagem articular é o recrutamento de células e fatores de crescimento existentes abaixo da placa subcondral. Nesse sentido algumas técnicas cirúrgicas têm sido propostas. A artroplastia de abrasão e a esponjialização envolvem a curetagem completa da lesão até o osso subcondral na primeira ou até o osso esponjoso na segunda. Entretanto técnicas menos invasivas têm sido mais usadas, por meio da realização de várias perfurações da placa subcondral ao longo da área lesionada. Tais perfurações podem ser realizadas por meio de brocas ou microfraturas (Frisbie, 2012).

A técnica mais utilizada tem sido a de microfratura, uma vez que a curetagem superficial é ineficiente, a esponjialização pode desestabilizar o osso subcondral e as perfurações com broca podem promover osteonecrose (Frisbie 2012) Estudos relatam o uso deste procedimento e

demonstram a formação de um tecido de reparação composto de fibrocartilagem (Pridie, 1959; Steadman, 2003; Getgood et al., 2009). E na sua maioria proporciona alívio dos sintomas por até dois anos (Getgood et al., 2009).

3.4. TÉCNICA DE MICROFRATURA

O primeiro relato da utilização desta técnica em equinos foi publicado por Frisbie et al. (1999) após o desenvolvimento da mesma por Steadman et al (1997). A técnica consiste na estimulação da medula óssea através de perfurações realizadas no osso subcondral, visando o extravasamento de sangue que preenche o defeito e rapidamente organiza em um coágulo. Células sanguíneas, elementos indiferenciados da medula óssea e plaquetas ficam retidos no defeito articular (Mankin, 1974). Células indiferenciadas e sanguíneas modulam-se em fibroblastos, que produzem um tecido de granulação reparativo. Com progressiva fibrose, o defeito forma um tecido cicatricial em 10 dias, que se torna menos vascular e mais esclerosado. Este tecido sofre uma progressiva condrificação, que ao final produz um tecido fibrocartilaginoso sobre o defeito. Para esta técnica, não existem contra indicações, contudo acredita-se que ela seja eficaz para pequenas lesões (inferior a 2 cm²) com o osso subcondral intacto (Pridie, 1959; Steadman, 2003).

Antes de realizar as perfurações, a camada calcificada da cartilagem deve ser removida da superfície do osso subcondral com um escafificador (*shaver*) ou cureta para melhorar a cicatrização do defeito (Frisbie et al., 2006). A microfratura pode ser feita a qualquer momento durante a artroscopia, mas prefere-se realizada no fim do procedimento, para que os elementos da medula óssea não se percam nos fluidos da lavagem articular. Além disso, uma vez que é feita a microfratura, os orifícios devem sangrar e gotículas de gordura podem ser liberadas da medula, reduzindo com isso a visualização artroscópica (Miller et al., 2004). As perfurações são realizadas perpendicularmente ao osso subcondral, com auxílio de um furador cônico. O uso de furadores em vez de brocas é aconselhado, devido à possível necrose térmica. As perfurações se iniciam da periferia da lesão para o centro e a profundidade de penetração é de aproximadamente 3 a 4 mm para dentro do osso subcondral, as perfurações são então distribuídas de modo uniforme ao longo do defeito com 3 a 4 mm de distância (Yi-Meng Yen e Steadman, 2003).

Esta técnica, quando utilizada isoladamente, produz apenas um tecido de reparação composto de colágeno I e III, de forma que as CTMs oriundas da estimulação da medula óssea não possuem a capacidade de produzir um tecido de reparação de boa qualidade quando utilizadas de forma única (Getgood et al., 2009).

3.5. CARTOGENINA COMO MODULADOR DE DIFERENCIAÇÃO DE CONDRÓCITOS

Várias moléculas têm sido testadas na busca de substâncias que possam estimular a diferenciação de células do tecido cicatricial da cartilagem articular em condrócitos (Johnson K et al., 2012). Dentre elas, a cartogenina se mostrou capaz de promover a diferenciação de células tronco mesenquimais (CTMs) em condrócitos. Esse efeito foi comprovado em um estudo *in vitro*, utilizando cartogenina e CTMs humanas, onde a molécula induziu a expressão de um conjunto típico de genes condrogênicos, originando nódulos com características e função de condrócitos. Estes nódulos continham marcadores que foram específicos para colágeno tipo

II e agrecan, além disso, não continham marcadores para condrócitos hipertróficos e células ósseas (Johnson et al., 2012).

Em outro ensaio utilizando cultura de explante de cartilagem de bovinos, a adição de cartogenina reduziu significativamente a liberação de óxido nítrico e também a liberação de glicosaminoglicanos devido à destruição da cartilagem, demonstrando o potencial efeito protetor da cartogenina sobre a cartilagem articular (Johnson et al., 2012). Também em modelo de osteoartrite induzida em ratos o membro tratado com 1 μ M de cartogenina, apresentou melhor sustentação do peso quando comparado ao membro não tratado (Johnson et al., 2012).

Estudos clínicos têm demonstrado que a cartogenina pode promover a regeneração de cartilagem hialina em ratos (Johnson et al., 2012) e coelhos (Xu et al., 2014). Em coelhos, a adição de cartogenina produziu significante melhora no aspecto macroscópico de defeitos condrais tratados com microfratura (Xu et al., 2014).

Em relação à toxicidade da cartogenina, foi atestado que, após sua administração intra-articular, a concentração no soro foi estimada em 0,1% da dose administrada intra-articular, um nível insignificante para produzir efeitos tóxicos (Johnson et al., 2012).

O mecanismo de como a molécula atua sobre as CTMs é através da ligação no terminal carboxílico da filamina A, deslocando o fator de transcrição beta (CBF β) do seu local de ligação citoplasmática, desta forma, o relocando para o núcleo da célula, onde se liga ao fator de transcrição de ligação (RUNX1) ao DNA. A associação do complexo CBF β - RUNX1, ativa a transcrição de proteínas envolvidas na diferenciação da cartilagem, como o colágeno tipo II, inibidores de metaloproteinases e agrecan (Johnson et al., 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo experimental foi conduzido atendendo todos os requisitos do comitê de ética em experimentação animal (CEUA/UFMG) sob o protocolo de número nº. 36 / 2014. Foram utilizadas cinco éguas e um cavalo, adultos sem raça definida pesando em média (\pm DP) 342 \pm 1,58 com a idade aproximada de 7,2 \pm 1,30 e escore corporal de 7,1 \pm 0,75 todos os animais provenientes da fazenda experimental professor Hélio Barbosa da EV-UFMG, no município de Pedro Leopoldo – MG. Os animais foram mantidos por um período de adaptação de 30 dias e durante todo o tempo do experimento no hospital veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, no município de Belo Horizonte – MG, em baias individuais de alvenaria. Foi fornecido água e feno *ad libitum* e ração¹ comercial duas vezes ao dia na quantidade de 1% do peso vivo e sal mineral 100g por dia.

Os seis equinos foram considerados hígidos após exame físico, laboratorial, além disso, foram submetidos a exames radiográficos ultrassonográficos. Uma semana antes do experimento ivermectina² 1% na dose 1 ml/50 kg intra muscular, ectoparasiticida fipronil³ pour-on 1 ml/10 kg, além de soro antitetânico⁴ 5,000 UI aplicado intra muscular no dia anterior à cirurgia. A

¹ Essence (Presence nutrição animal Ltda, Brasil)

² Ivermectina 1% (Ouro fino saúde animal Ltda, Brasil)

³ Topline® (Merial saúde animal Ltda, Brasil)

⁴ Vencosat® (Vencofarma proteção a saúde animal Ltda, Brasil)

lesão foi induzida em ambas as articulações femoropatellares de cada animal, sendo que uma delas pertencia ao grupo controle e a outra ao grupo tratado. Para o grupo tratado foi utilizado seis articulações, e através de um sorteio as articulações foram subdivididas em três articulações direitas e três esquerdas, e as seis articulações contralaterais foram consideradas o grupo controle.

O primeiro procedimento artroscópico para indução da lesão e realização das microperfurações foi considerado o tempo 0 (T-0). Para a intervenção cirúrgica os animais foram submetidos a jejum sólido de 12 horas e jejum hídrico de 6 horas. O protocolo anestésico era composto de: xilazina⁵ (0,7mg/kg, IV), como medicação pré anestésica, midazolam⁶ (0,1 mg/Kg, IV) e cetamina⁷ (2mg/Kg, IV) como agentes indutores e a manutenção foi feita com isoflurano⁸ vaporizado a 100% de oxigênio. Os animais foram mantidos em decúbito dorsal, a articulação femurotibiopatelar foi submetida à tricotomia, antisepsia com digluconato de clorexidina 2% e remoção com solução alcoólica a 70%. Após disposição dos panos de campo, foi criado um portal de um centímetro na pele e cápsula articular, com auxílio de uma lâmina de bisturi número 11, entre os ligamentos patelares medial e intermédio, distal a patela. Através deste portal foi introduzida a camisa do artroscópio⁹, acoplada ao trocarte¹⁰. Após o conjunto adentrar a articulação, o trocarte foi removido e a câmera¹¹ foi acoplada à camisa do artroscópio. Um segundo portal de um centímetro foi criado entre os ligamentos patelares intermédio e lateral, onde através da abertura, foi introduzida uma cureta número 1, para realização da lesão condral na porção distal da tróclea lateral de forma quadrada com 1 cm², preservando a integridade do osso subcondral sob a tróclea lateral do fêmur de ambas as articulações.

Após completa exposição do osso subcondral, a mensuração dos lados da lesão foi realizada utilizando-se a ponta de uma pinça Ferris Smith¹², que apresenta 1 cm após sua total abertura (Fig.1). Feito isso, o osso subcondral foi perfurado com o auxílio de um pino de Steinman de 1,5 mm de diâmetro, acoplado a uma microretífica¹². Foram feitas um total de cinco perfurações por lesão, uma no centro e quatro em nas extremidades. Os pinos eram aprofundados até que houvesse o extravasamento de glóbulos de gordura supostamente advindos da medula óssea. Tal procedimento foi realizado em todas as articulações.

Nas articulações do grupo tratado, aplicações intra-articulares de cartogenina foram realizadas ao final da primeira artroscopia e semanalmente por mais três semanas. Para tanto, previamente ao procedimento cirúrgico a solução mãe foi preparada em uma capela de fluxo laminar, adicionando 5mg de cartogenina¹³ em 70 ml de dimetil sulfóxido¹⁴. Após a diluição, alíquotas

⁵ Sedomin (Laboratório könig Ltda, Argentina)

⁶ Dormium (Láboratório União química Ltda, Brasil)

⁷ Dopalen (Laboratório Ceva Ltda, Brasil)

⁸ Isoforine (Laboratório Cristália Ltda, Brasil)

⁹ Camisa artroscópica (Karl Storz)

¹⁰ Trocarte rombo (Karl Storz)

¹¹ Câmera (Karl Storz)

¹² Pinça Ferris Smith (Karl Storz)

¹³ Kartogenin (Sigma-Aldrich®,USA)

¹⁴ DMSO p.a ≥ 99,9% (Sigma-Aldrich®,USA)

contendo 1 ml da solução foram separadas em tubos do tipo eppendorf, que foram imediatamente congeladas a -20°C .

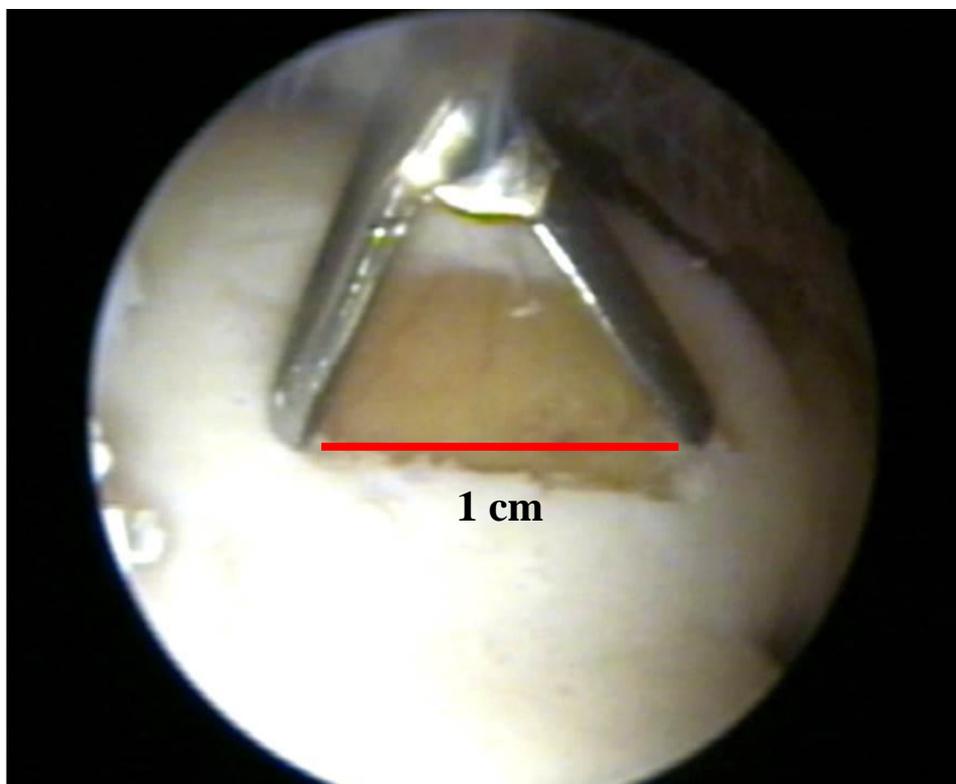


Figura 1. Imagem artroscópica da articulação femuropatral, onde se observa a padronização do diâmetro da lesão condral na tróclea lateral distal T-0, abertura da pinça de Ferris Smith sobre a lesão.

Ao final da artroscopia e nos dias de tratamento, o tratamento era preparado utilizando 1 ml da solução mãe de cartogenina adicionada à 19 ml de Ringer com lactato chegando a concentração final de $20\ \mu\text{M}$. Um volume igual de solução Ringer lactato foi administrado como placebo nas articulações do grupo controle. As soluções foram sempre preparadas pela mesma pessoa e entregues ao cirurgião em uma seringa de 20 ml acoplada a um filtro de seringa de 0,20 micras, sem identificação e coberta por esparadrapo, de forma que o estudo fosse conduzido de maneira cega durante todo o período experimental.

Os demais tratamentos foram divididos semanalmente totalizando 3 semanas, sendo este realizado no dia da coleta do líquido sinovial, após a artrocentese e coleta da amostra de sinóvia, um filtro de seringa de 0,20 micras era acoplado na seringa contendo os tratamentos e injetado intra articular, este procedimento foi realizado de maneira cega, da mesma forma descrita anteriormente mantendo a mesma dose utilizada no dia da cirurgia.

Após procedimento cirúrgico todos os animais receberam 20.000 UI/kg de penicilina intramuscular e gentamicina na dose de 6,6 mg/kg intravenoso (IV) uma vez ao dia, durante três dias, além disso, receberam 2,2 mg/kg de fenilbutazona IV, uma vez ao dia, durante três dias.

Os animais foram acompanhados durante o período de 60 dias, quando foram submetidos a exame físico diário, sendo realizada ausculta cardíaca, respiratória e intestinal, aferição da temperatura corporal, avaliação das mucosas e semanalmente foi feita avaliação de claudicação, segundo a graduação estipulada pela AAEP (AAEP, 1996), conforme descrito na Tab. 1. Além desta avaliação, foi criada uma segunda escala, visando alterações na fase cranial da passada dos membros posteriores Tab. 2.

Tabela 1. Graduação de claudicação, segundo a Associação Americana de Veterinários de Equinos.

Grau	Descrição
0	Claudicação não perceptível em qualquer circunstância.
1	A claudicação é difícil de observar e não é consistentemente aparente, independentemente das circunstâncias (por exemplo, sob a sela, circulando, declives, superfícies duras, etc).
2	A claudicação é difícil de observar em uma caminhada ou trote, quando em uma linha reta, mas consistentemente aparente sob certas circunstâncias (por exemplo, peso de transporte, circulando, inclinações, superfície dura, etc.).
3	Claudicação é constantemente observável em trote em todas as circunstâncias.
4	A claudicação é óbvia em uma caminhada.
5	A claudicação produz mínima sustentação de peso em movimento e / ou em repouso ou uma completa incapacidade de se mover.

Tabela 2. Graduação de claudicação, visando alterações na fase cranial da passada.

Grau	Descrição
0	Não claudica
1	Encurtamento da fase de avanço
2	Encurtamento da fase de avanço e de elevação, claudicação evidente
3	Dificuldade em caminhar e reluta em trotar
4	Não apoia o membro no solo

A análise do líquido sinovial foi realizada no T-0, nas três primeiras semanas de pós-operatório e no dia da biópsia do tecido cicatricial (T-60). As amostras foram coletadas pela punção do recesso lateral da articulação femoropatelar com agulha 40x1,2mm, após sedação (xilazina 0,5mg/Kg, IV) e antisepsia de rotina. Um volume de 10 ml foi obtido, sendo distribuído em dois tubos, com EDTA e sem anticoagulante para exame físico, químico e exame citológico. Ao exame físico foi avaliado a cor e aspecto do líquido sinovial no momento da coleta. A densidade e a concentração proteica foram obtidas por refratometria. No exame químico, a concentração de fibrinogênio foi através do método de precipitação pelo calor (Schalm et al., 1975) e também classificado em escores de 0 a 3, onde 0 representa ausência de fibrinogênio; 1 representa concentração de fibrinogênio menor que 100 mg/dl; 2 representa entre 100 e 200 mg/dl e 3 maior que 200 mg/dl. A qualidade de mucina foi analisada através do teste do coágulo em ácido acético glacial 7N e água destilada (Parry, 1997). Esse parâmetro foi classificado seguindo a graduação estipulada por Coles (1984), descrito na Tab. 3.

Tabela 3. Graduação de coágulo de mucina.

Grau		Descrição
1	Normal	Coágulo aglutinado e pegajoso numa solução transparente
2	Regular	Massa amolecida mergulhada em uma solução ligeiramente turva
3	Deficiente	Pequena massa friável em uma solução turva
4	Muito deficiente	Poucos flocos presentes numa solução turva

No exame citológico foi efetuada a contagem global e diferencial de células nucleadas e a contagem do número de hemácias, utilizando a Câmara de Neubauer. As células nucleadas foram quantificadas em porcentagem.

As avaliações radiográficas da articulação foram realizadas antes e com 30 e 60 dias da indução lesional. Utilizaram-se projeções lateromedial oblíqua e caudocranial com exposição a 90Kv e 3.5 Ma, seguindo o sistema de classificação radiográfica estipulada por Crawford (1991), descrita na Tab. 4.

Tabela 4. Escala radiográfica de lesão articular (Crawford 1991).

Grau	Descrição
0	Normal
1	Sem alteração óssea ou cartilagem, leve distensão da articulação e efusão
2	Mínimas alterações ósseas, osteófitos <1 mm, sem evidência de perda de cartilagem
3	Alterações ósseas moderadas, osteófitos 1-2 mm, lise óssea ou perda de cartilagem
4	Alterações graves osso, osteófitos > 2 mm, com / sem evidência de perda de cartilagem e/ou lise óssea

As articulações femoropatulares também foram avaliadas semanalmente por meio de ultrassonografia, utilizando uma probe linear utilizando a frequência entre 7 e 10 Mhz montada em aparelho de uso veterinário (M5, Mindray). Para avaliação da superfície articular e da presença de erosões sobre o osso subcondral, utilizou-se o escore de graduação estipulado por Larsen (1974), descrito na Tab. 5. Junto a essa avaliação, também foi mensurado a área dos recessos lateral e femurotibial medial da articulação femuropatelar com intuito de avaliar efusão articular.

Tabela 5. Escala ultrassonográfica de lesão articular (Larsen 1974).

Grau	Descrição
0	Contorno ósseo intacto e espaço articular normal
1	Erosão inferior a 1 mm de diâmetro ou espaço articular com estreitamento
2	Uma ou várias pequenas erosões, diâmetro superior 1mm
3	Erosão marcada
4	Erosões graves, onde normalmente não há espaço articular e os contornos ósseos originais são parcialmente preservados
5	Alterações graves, onde os contornos ósseos originais foram destruídos

No T-60 os animais foram submetidos novamente à artroscopia para avaliação das características macroscópicas do tecido de reparação, seguida de artrotomia para realização da biópsia. Os animais foram submetidos a protocolo anestésico e preparação conforme descrito na primeira artroscopia. Após a distensão da capsula articular com 40 ml de ringer com lactato, um portal de 1 cm foi feito entre o ligamento patelar lateral e o ligamento patelar intermédio, um centímetro distal a patela, em seguida foi introduzida a camisa do artroscópio, acoplada ao trocater, e após o conjunto adentrar a articulação, o trocater foi removido e a câmera acoplada à

camisa do artroscópio. Desta forma foi realizada a avaliação macroscópica do tecido de reparação, observando porcentual de lesão recoberta, preenchimento da lesão, presença de irregularidades, fibrilações, erosões, sinovite, proliferações, aderências às bordas e aderência ao osso subcondral Tab. 6.

Após a avaliação macroscópica de ambas as articulações, o conjunto com a camisa e artroscópio foi removido e após isso foi realizada artrotomia, iniciando uma incisão sobre a tróclea lateral do fêmur de aproximadamente 7 cm, distal a patela entre os ligamentos patelares intermédio e lateral. Após incisão da pele, tecido subcutâneo e fâscias do joelho, houve exposição do tecido adiposo femoropatelar que foi amputado. A cápsula articular foi incidida com auxílio de uma tesoura Metznbbaum. Com a exposição da tróclea lateral, realizou-se a biópsia da transição entre tecido cicatricial e borda do defeito condral utilizando-se um lamelótomo de Falcão-Faleiros. Posteriormente, promoveu-se lavagem articular seguida da sutura de cápsula articular, fâscias e pele e os animais foram recuperados da cirurgia.

Os fragmentos de biópsia foram imediatamente fixados em formalina a 10% e posteriormente, processados segundo técnicas de rotina, emblocados em parafina e obtidos cortes de 5 micrômetros. Os cortes histológicos foram submetidos à técnica de desparafinização em xilol, e à hidratação em uma sequência de etanol absoluto, etanol a 95%, etanol a 70% e água destilada, em seguida os cortes foram corados pelos métodos de hematoxilina-eosina, pricosírius red, azul de toluidina. Para avaliação do processo de reparação, foi quantificado o porcentual de cartilagem hialina neoformada. Também foi avaliada a predominância de condrócitos (ou perda de celularidade), organização celular e tecidual da cartilagem, qualidade da matriz extracelular, presença de fibras colágenas e fibrose conforme descrito anteriormente (Wilke et al., 2007).

Tabela 6. Graduação do preenchimento da lesão, 60 dias após indução da lesão condral, adaptado de Yamada et al., (2011).

Preenchimento da lesão	Grau	Descrição
	2	Ótimo (lesão completamente preenchida)
	1	Bom (preenchimento, menor quantidade de tecido cicatricial, porém sem falhas)
	0	Ruim (aumento do diâmetro da lesão)

Tabela 7. Escore da presença de proliferações do tecido de reparação, 60 dias após indução da lesão condral, adaptado de Yamada et al., (2011).

Proliferações	Grau	Descrição
	Presente	Leve, moderado, intenso
	Ausente	

Tabela 8. Escore de aderência as bordas do tecido de reparação, 60 dias após indução da lesão condral, adaptado de Yamada et al., (2011).

Aderência as bordas	Grau	Descrição
	2	Bem aderido
	1	Pouco aderido
	0	Não aderido

Tabela 9. Escore de aderência ao osso subcondral do tecido de reparação, 60 dias após indução da lesão condral, adaptado de Yamada et al., (2011).

Aderência ao osso subcondral	Grau	Descrição
	2	Bem aderido
	1	Pouco aderido
	0	Não aderido

Tabela 10. Escore de presença de irregularidades no tecido de reparação, 60 dias após indução da lesão condral, adaptado de Yamada et al., (2011).

Irregularidades	Grau	Descrição
	0	Ausente
	1	Discretas ao redor da lesão
	2	Graves evidentes ao redor da lesão

Tabela 11. Escore de presença de fibrilações do tecido de reparação, 60 dias após indução da lesão condral, adaptado de Yamada et al., (2011).

Fibrilações	Grau	Descrição
	0	Ausente
	1	Discreta
	2	Moderada

Tabela 12. Escore de presença de erosões no tecido e ao redor da lesão condral, 60 dias após indução da lesão condral, adaptado de Yamada et al., (2011).

Erosões	Grau	Descrição
	0	Ausente
	1	Moderada
	2	Grave

Tabela 13. Escore de presença de sinovite, 60 dias após indução da lesão condral, adaptado de Yamada et al., (2011).

Sinovite	Grau	Descrição
	1	Ausente
	2	Leve hiperemia
	3	Moderada (membrana sinovial com hiperemia acentuada)
	4	Grave (hiperemia acentuada a membrana sinovial/ presença de proliferações sinoviais)

Tabela 14. Escores de proporção de cartilagem hialina de acordo com a porcentagem de sua presença no tecido de reparo.

Grau	%
0	0
1	20
2	40
3	60
4	80
5	100

Os dados paramétricos foram submetidos a análise de variância em blocos ao acaso considerando-se os efeitos de tempo, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. A comparação entre grupos no mesmo tempo será realizada pelo teste t de Student. Os dados não paramétricos serão analisados quanto ao efeito do tempo pelo teste de Friedman seguido pelo teste de Dunn e quanto ao efeito do tratamento pelo teste de Mann Whitney. Para todos os testes será considerado o nível de significância de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. INDUÇÃO DE LESÃO E PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO

No primeiro procedimento artroscópico T-0, não se observou qualquer alteração das articulações. A lesão condral na porção distal tróclea lateral, foi realizada de forma satisfatória. Em todas as articulações, gotas de gordura foram obtidas durante a perfuração do osso subcondral, demonstrando acesso à medula óssea. Todos os animais comportaram-se bem no pós-operatório imediato e nos dias subsequentes, não sendo observadas reduções no consumo de feno e ração e os mesmos se mantiveram em estação maior parte do dia, não havendo distribuição desigual de peso entre os membros posteriores ou alteração em sua mobilidade.

Algum grau de claudicação foi observado em todos os animais nas semanas seguintes à cirurgia. Entretanto, houve predomínio de claudicações discretas. Segundo a classificação da AAEP, considerando membros pélvicos direito e esquerdo, o grau médio de claudicação ($\pm DP$) foi de $1,42 \pm 1,31$ na primeira semana e $0,58 \pm 1,08$ na oitava semana. Não houve diferença estatística entre tempos ou grupos, considerando-se ambas classificações para claudicação (Fig.2).

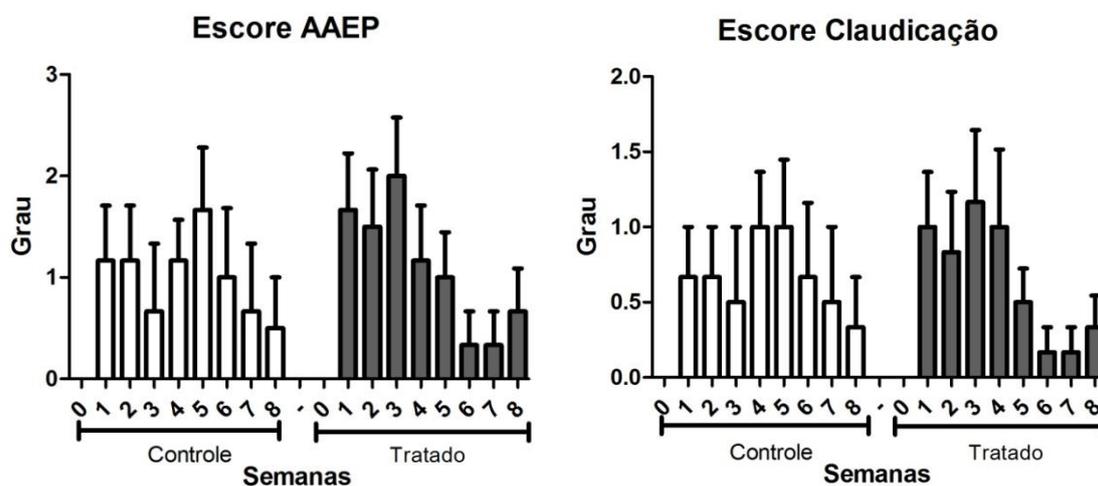


Figura 2. Médias e erros-padrão da avaliação de claudicação segundo AAEP ou metodologia própria de equinos submetidos à lesão condral na tróclea lateral do fêmur, tratados ou não com cartogenina.

5.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E ULTRASSONOGRÁFICA

Pelo exame radiográfico da articulação femurotibiopatelar não houve alterações detectáveis da superfície e do espaço articular. Apenas foram visualizados os pontos de perfuração realizados no osso subcondral durante a execução da técnica de micro perfuração na tróclea lateral nos

tempos 30 e 60 (Fig.3). Achados semelhantes foram encontrados na avaliação ultrassonográfica, onde também foram visualizados os locais das perfurações no osso subcondral (Fig.4).

Em relação às medidas dos recessos lateral e femorotibial medial da articulação femuropatelar (Fig. 5), houve aumento significativo quanto à circunferência e à área. Isso ocorreu a partir da primeira semana pós-operatória, havendo regressão gradual com o passar das semanas, caracterizando efusão articular, em ambas as articulações (Fig.6 -7). Nenhuma diferença estatística foi detectada entre grupos em um mesmo tempo. Durante avaliação do recesso medial e lateral, também foi encontrado proliferação sinovial (Fig. 5), que se manteve até o fim do estudo.

Em relação às medidas dos recessos lateral e femorotibial medial da articulação femuropatelar (Fig. 5), houve aumento significativo quanto à circunferência e à área. Isso ocorreu a partir da primeira semana pós-operatória, havendo regressão gradual com o passar das semanas, caracterizando efusão articular, em ambas as articulações (Fig.6 -7). Nenhuma diferença estatística foi detectada entre grupos em um mesmo tempo. Durante avaliação do recesso medial e lateral, também foi encontrado proliferação sinovial (Fig. 5), que se manteve até o fim do estudo.



Figura 3. Imagem radiográfica de exposição lateromedial oblíqua da articulação femurotibiopatelar de equinos submetidos a lesão condral e tratados com microperfurações subcondrais, 30 dias após indução da lesão. As setas mostram os pontos de perfuração no osso subcondral da tróclea lateral.



Figura 4. Imagem ultrassonográfica cranial da tróclea lateral na segunda semana pós operatório de equinos submetidos a lesão condral e tratados com microperfurações subcondrais. As setas indicam os pontos de perfuração realizados no osso subcondral.



Figura 5. Imagem ultrassonográfica demonstrando a mensuração da circunferência e da área do recesso femuropatelar medial da articulação femuropatelar direita de um equino submetido à lesão condral. Setas amarelas indicam proliferações sinoviais (A). Mensuração da circunferência e área do recesso lateral da articulação femuropatelar direita (B).

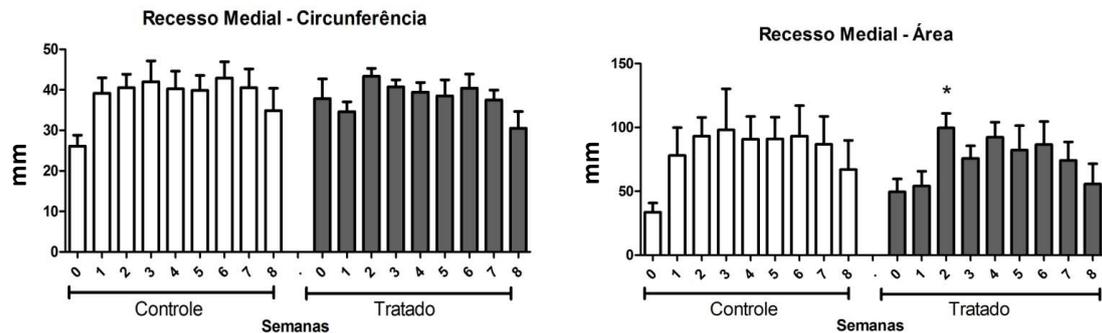


Figura 6. Médias e erros-padrão da circunferência e área do recesso femuropatelar medial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral na tróclea lateral do fêmur, tratados ou não com cartogenina.

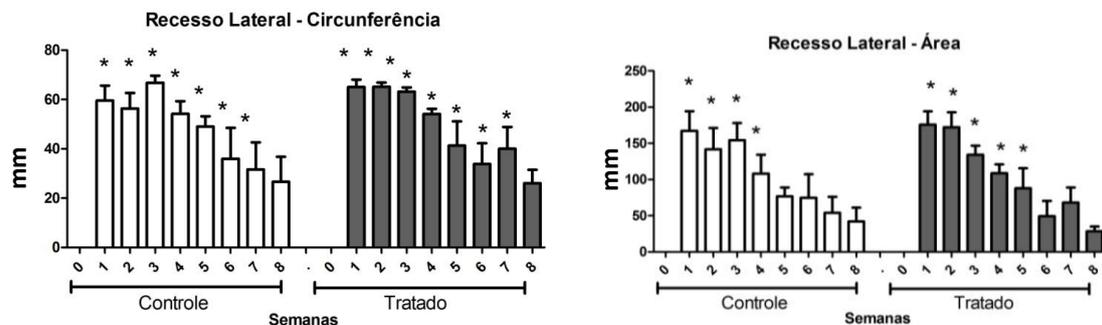


Figura 7. Médias e erros-padrão da circunferência e da área do recesso lateral da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral na tróclea lateral do fêmur, tratados ou não com cartogenina.

5.3. ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL

Amostras de líquido sinovial foram facilmente obtidas até a terceira semana. Entretanto, a partir desse momento, não foi possível obtenção de amostras em quantidade suficiente para realizar todas as análises. Desta forma, os resultados são apresentados até a terceira semana.

Durante as coletas, a coloração apresentou variações entre amarela, âmbar e vermelho e o aspecto variou entre límpido e turvo. Houve oscilações na qualidade do coágulo de mucina (Fig. 8), no pH (Fig.9) e na concentração de fibrinogênio (Fig.10), contudo sem significância estatística. Aumentos em relações aos valores basais foram verificados na concentração de proteína (Fig.11) e nas contagens de hemácias (Fig.12) e leucócitos (Fig.13) a partir da primeira semana, contudo sem que houvesse diferença entre grupos.

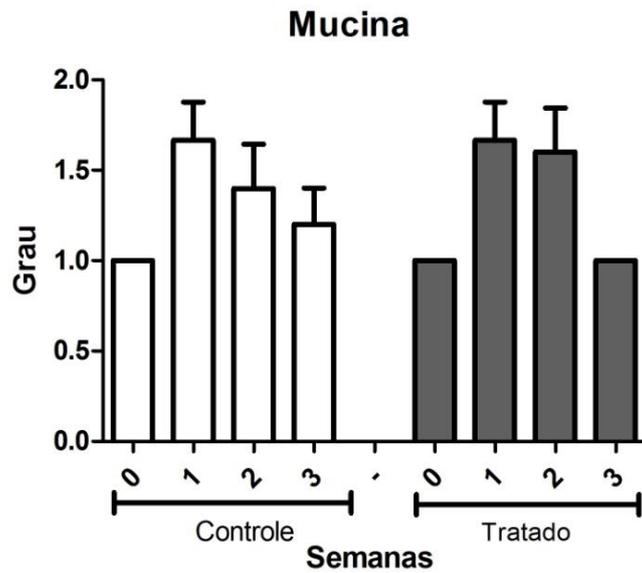


Figura 8. Médias e erros-padrão dos graus de coagulação de mucina do líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.

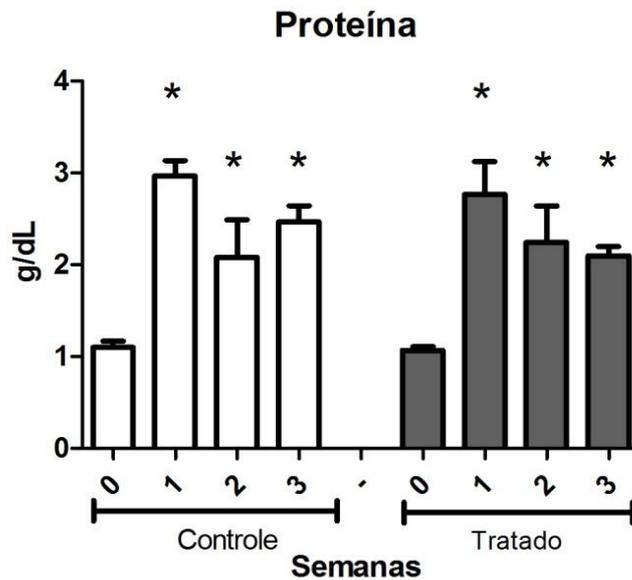


Figura 9. Médias e erros-padrão da concentração de proteínas no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.

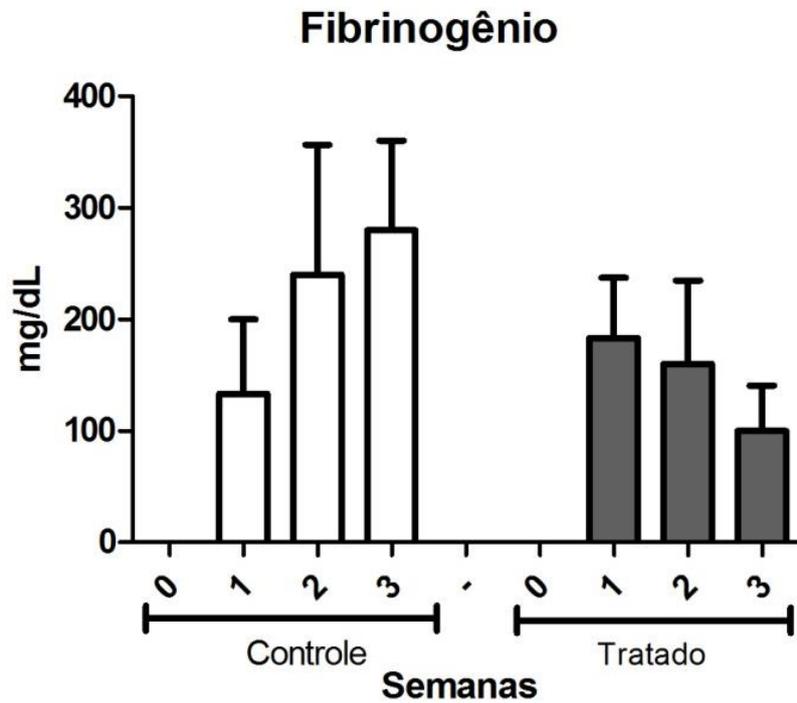


Figura 10. Médias e erros-padrão do fibrinogênio no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.

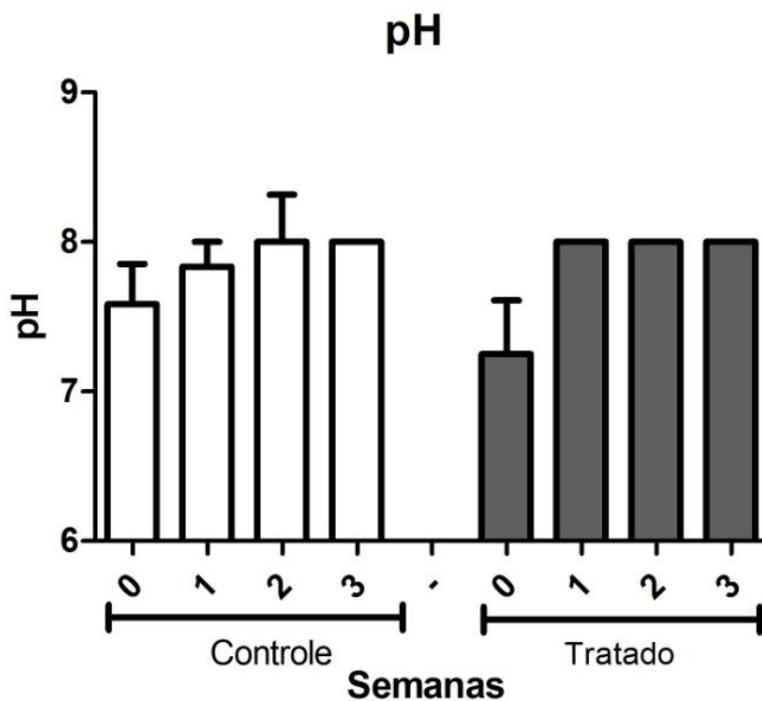


Figura 11. Médias e erros-padrão dos valores de pH no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.

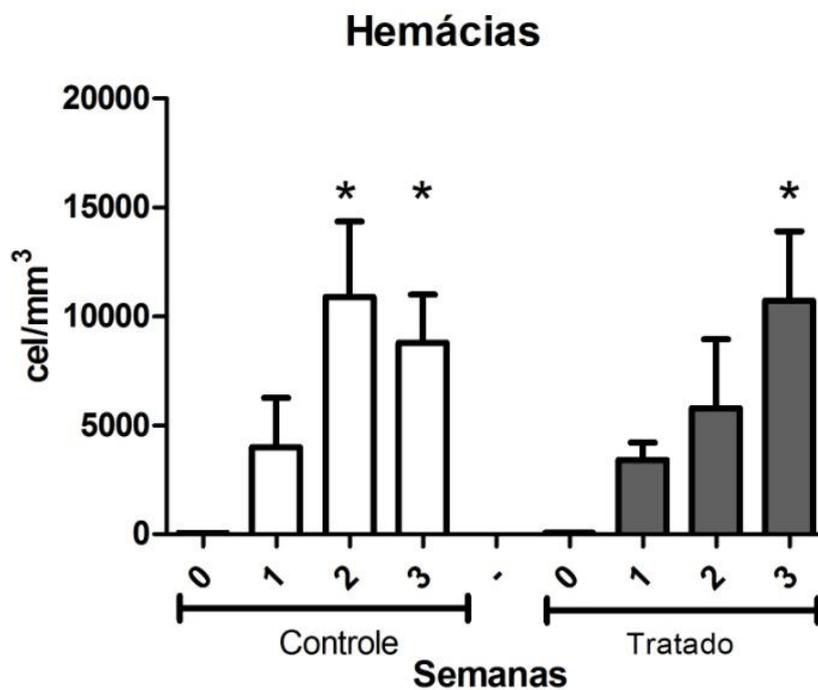


Figura 12. Médias e erros-padrão dos valores de hemácias no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.

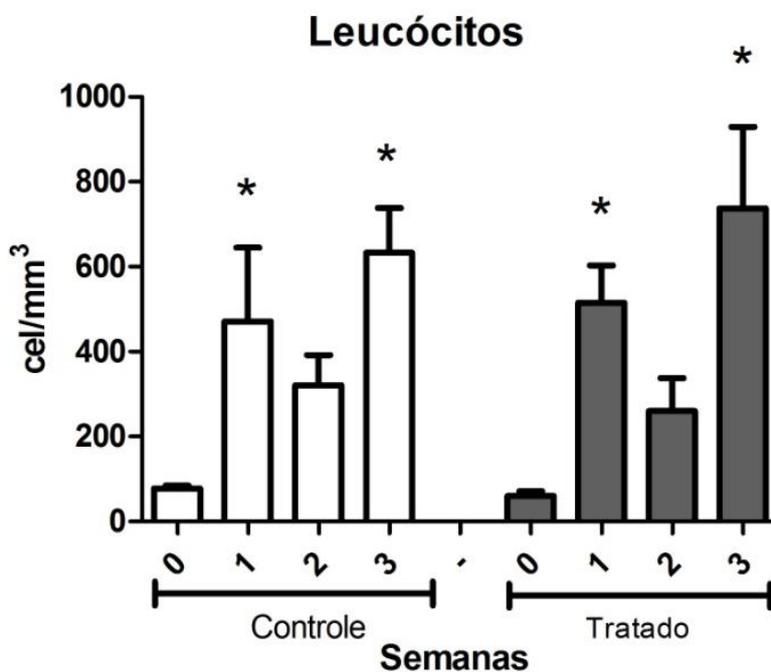


Figura 13. Médias e erros-padrão de leucócitos no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.

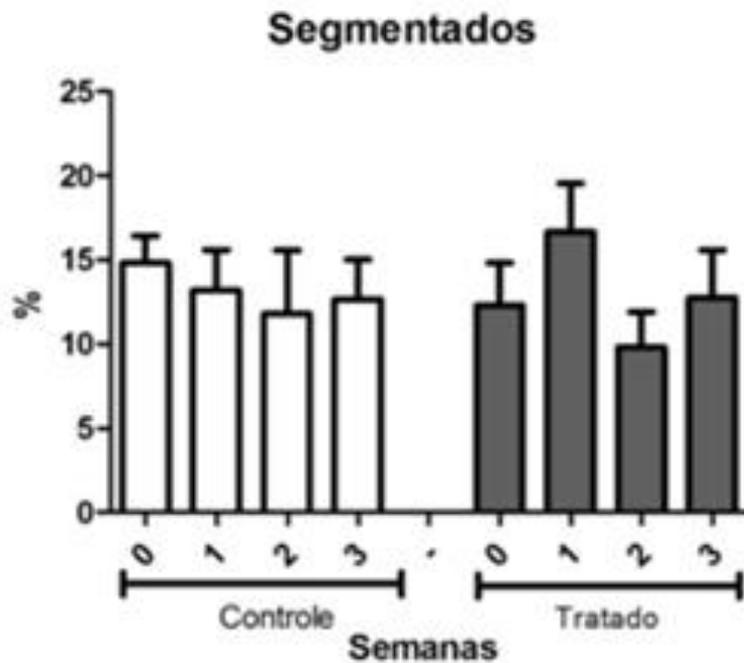


Figura 14. Médias e erros padrão de segmentados no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.

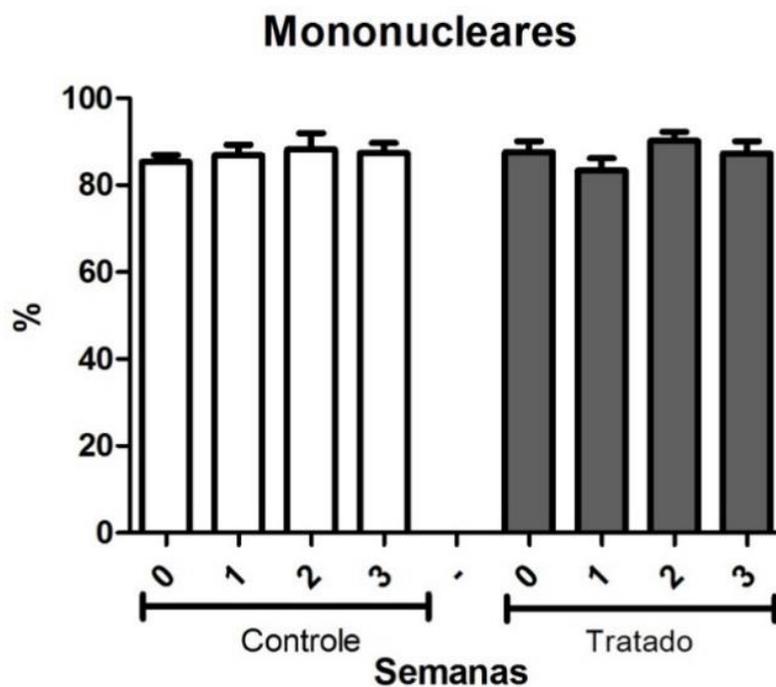


Figura 15. Médias e desvios-padrão de células mononucleares no líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea do fêmur tratados ou não com cartogenina.

5.4. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E REALIZAÇÃO DA BIÓPSIA

Durante a segunda artroscopia aos 60 dias verificou-se, em ambos os grupos de articulações, sinovite moderada com fibrilações e erosões na cartilagem articular, envolvendo principalmente o bordo da lesão. Em ambos os grupos, houve proliferação tecidual na área da cicatriz, contudo o preenchimento da lesão foi incompleto e acompanhado de irregularidades ao redor das lesões (Fig.16). Quanto o percentual de lesão recoberta, aderência às bordas e ao osso subcondral os achados foram semelhantes nos dois grupos. Não houve diferença significativa em grupos, para nenhuma das variáveis analisadas (Tab. 15).

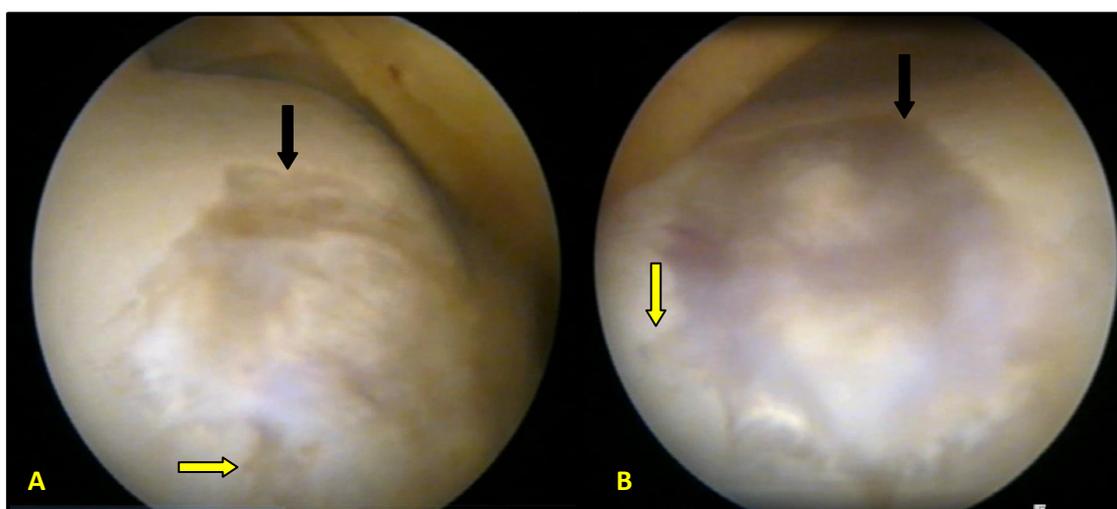


Figura 16. Avaliação das características macroscópicas T-60, articulação controle (A) e articulação tratada (B). Setas amarelas indicam presença de erosões levando aumento do diâmetro da lesão. Setas pretas indicam áreas de preenchimento incompleto sobre o defeito condral.

Tabela 15. Médias e desvios-padrão das variáveis do tecido de reparação, durante a avaliação videoartroscópica no tempo – 60 da articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.

Variável	Unidade	Controle		Tratado		Valor de P
		Média	DP	Média	DP	
Irregularidades	Escore	1,42	0,49	1,58	0,49	0,6
Fibrilações	Escore	2,08	0,86	1,58	0,8	0,4
Erosão	Escore	0,75	0,76	0,92	0,66	0,67
Sinovite	Escore	3	1,27	2,5	1,05	0,46
Porcentagem de lesão recoberta	%	58%	33,13%	43,30%	21,60%	0,52
Aderência as bordas	Escore	1	0,63	1,17	0,75	0,72
Aderência ao osso subcondral	Escore	1,5	0,55	1,17	0,75	0,48
Proliferações	Escore	0,67	1,03	0,83	1,17	0,79

Tabela 16. Ocorrência de proliferações no tecido cicatricial.

Animal	Articulação tratada	Proliferações	Articulação controle	Proliferações
1	E	Presente leve	D	Presente moderado
2	D	Presente intenso	E	Ausente
3	D	Ausente	E	Presente moderado
4	E	Ausente	D	Ausente
5	E	Ausente	D	Ausente
6	E	Ausente	D	Ausente

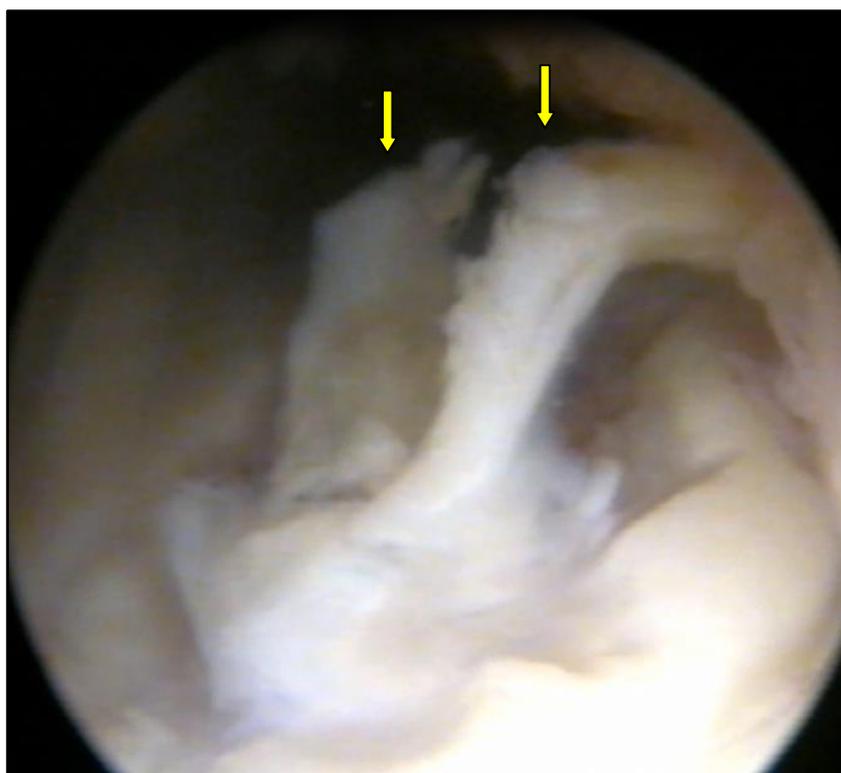


Figura 17. Imagem artroscópica da articulação femuropatelar tratada com cartogenina, setas indicam intensas proliferações do tecido de reparação.

A biópsia foi realizada de maneira satisfatória, sendo que a artrotomia permitiu boa visualização da porção distal da tróclea lateral, permitindo bom posicionamento do lamelótomo de Falcão-Faleiros sobre o tecido de reparação e área de transição de tecido sadio, as amostras coletadas tinham aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, o que permitiu uma boa quantidade de material para análise histológica (Fig. 18).

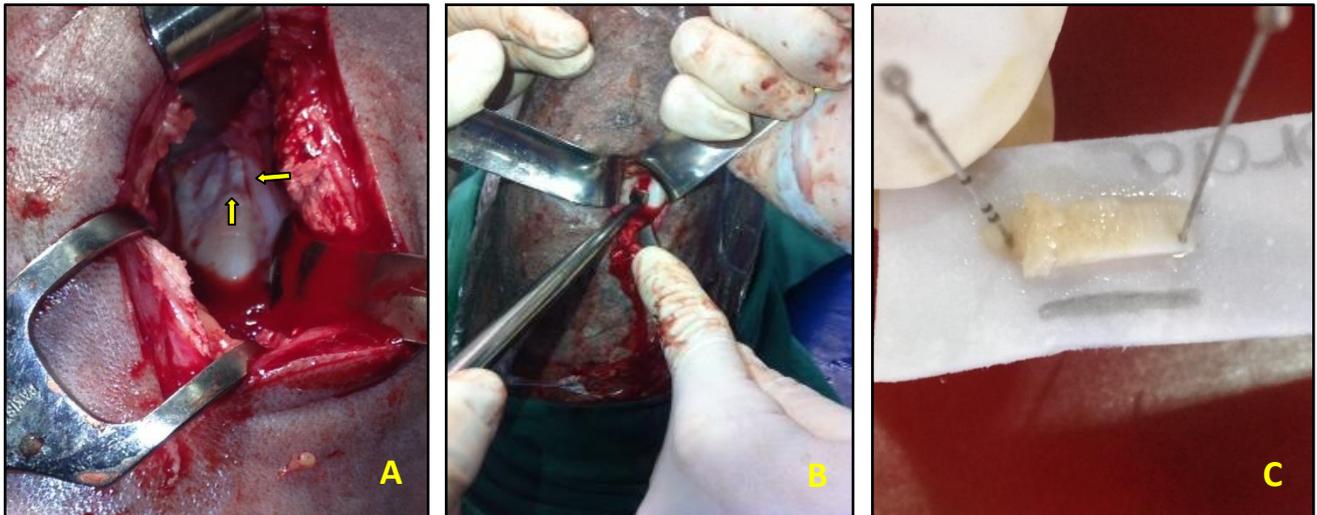


Figura 18. Artrotomia realizada sobre a tróclea lateral, setas indicam o tecido de reparação neoformado (A). Posicionamento do lamelótomo de Falcão Faleiros, para realização da biópsia (B). Amostra do tecido após fixação com formalina 10% (C).

5.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Durante a avaliação das lâminas coradas pelo método de H&E, o tecido de reparação, apresentou predomínio de fibras colágenas desorganizadas, associada à perda de condrócitos (Fig.19). Em alguns segmentos do corte histológico, foi constatado presença de uma matriz bem organizada, característica de cartilagem hialina contendo condrócitos jovens onde era circundado por uma outra matriz composta por fibrocartilagem (Fig.20). Estes achados foram semelhantes em ambos os grupos de articulações, sem diferença estatística (Fig,21). Na coloração por Picrosírius Red, o tecido de reparação foi confirmado como fibrocartilagem, com predomínio colágeno tipo I em ambos os grupos avaliados (Fig.22). Nos locais onde houve a formação da matriz com características de cartilagem hialina, a coloração por Picrosírius foi negativa. Já a coloração de azul de toluidina houve pouca marcação sobre a fibrocartilagem e nos locais onde houve a formação de cartilagem do tipo hialina.

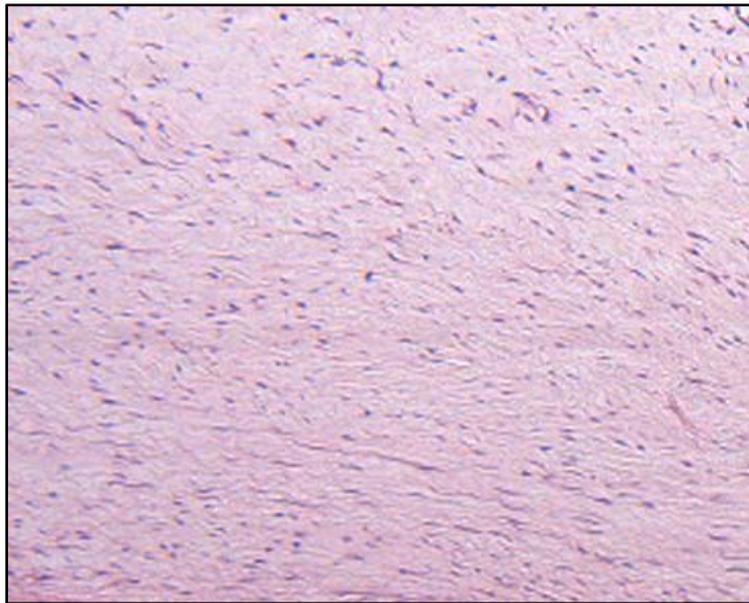


Figura 19. Fotomicrografia do tecido de reparação, T-60. Observa-se predomínio de fibras colágenas desorganizadas e células fibroblastóides (H&E, Objetiva: 10x).

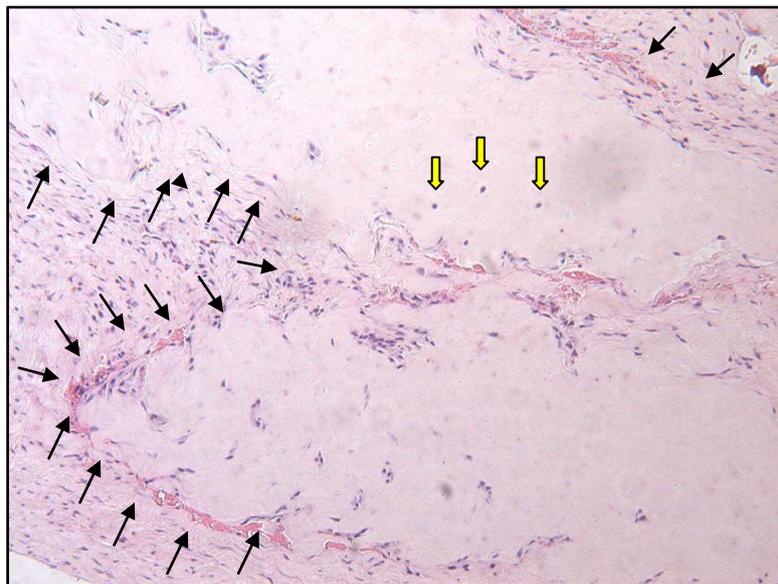


Figura 20. Fotomicrografia do tecido de reparação, T-60. Observa-se entre setas negras a presença de matriz colágena bem organizada, com presença de condrócitos (setas amrelas), com características de cartilagem hialina (H&E, Objetiva: 20x).

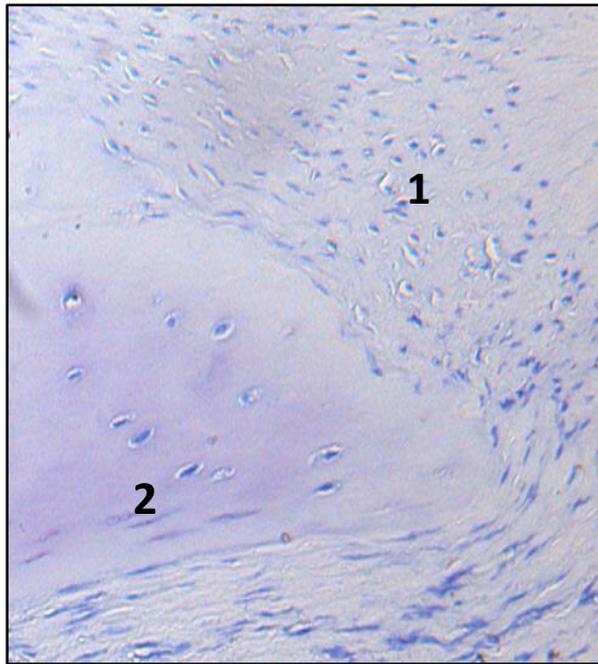


Figura 21. Fotomicrografia do tecido de reparação, T-60. Apresenta fraca coloração na matriz territorial e interterritorial, (1) região com fibras desorganizadas, (2) matriz colágena com características de cartilagem hialina (Azul de toluidina, Objetiva 20x).

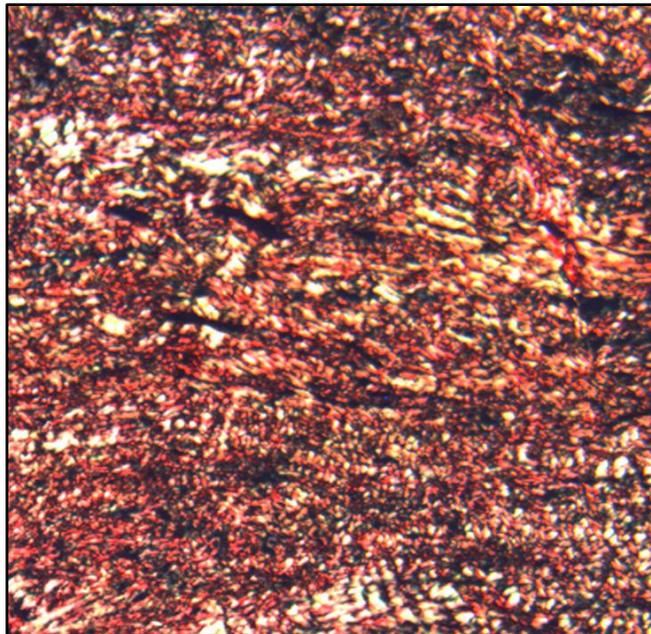


Figura 22. Fotomicrografia de luz polarizada, T-60. Apresenta predomínio de fibras colágenas de coloração amarelo e vermelho (colágeno tipo I) (Picrosírius red, Objetiva: 10x).

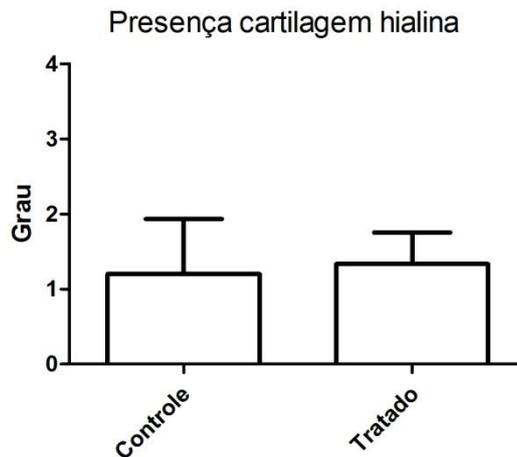


Figura 23. Médias e erros padrão da formação de cartilagem hialina na articulação femuropatelar de equinos submetidos à lesão condral da tróclea lateral do fêmur tratados ou não com cartogenina.

6. DISCUSSÃO

6.1. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E ULTRASSONOGRÁFICA

O exame radiográfico da articulação femurotibiopatelar mostrou ser eficiente para avaliação do espaço articular e visualização dos pontos de perfuração do osso subcondral de ambas as articulações nos tempos 30 e 60 dias. Não foram encontradas outras alterações nos tecidos articulares. Esse fato difere dos achados de McIlwraith (2011), onde foram encontradas proliferações ósseas, formação de osteófitos, lise e opacidade do defeito. A lesão condral não foi possível ser visualizada, fato este ocorrer, quando à grande perda da cartilagem, redução do espaço articular e mudança de 30-40% na densidade mineral óssea (Greenfield, 1986). Já a avaliação ultrassonográfica se mostrou mais eficaz para visualização de todos os componentes articulares, incluindo tecidos moles e estruturas ósseas.

Normalmente o recesso femuropatelar medial da articulação femuropatelar possui uma certa quantidade de líquido sinovial (Swiderski, 2005). Condizendo com a avaliação realizada no tempo 0. Quando ao recesso lateral este normalmente não é visualizado em cavalos normais (Denoix, 2008).

No presente estudo, os recessos medial e lateral apresentaram aumento gradual quanto à circunferência e área, ao passar das semanas após a indução da lesão, ocasionado pelo processo inflamatório desencadeado na articulação femuropatelar, e consequente efusão articular. A redução da área dos recessos foi condizente com a diminuição do processo inflamatório, o que não diferiu entre as articulações. Segundo Swiderski (2005) o fato de encontrar proliferações sinoviais durante as avaliações dos recessos, este achado é comum e considerado um achado inespecífico.

6.2. MODELO DE LESÃO CONDRAL

Neste estudo o modelo de indução de lesão foi através do uso de cureta, guiada por videoartroscopia. Durante a execução da lesão, levou-se em conta a remoção do plano

calcificado, devido a sua interferência no processo de cicatrização, como é descrito por Frisbie et al., (2006). A técnica de perfuração do osso subcondral foi realizada de maneira satisfatória, através do uso de microrretífica em baixa rotação, diferindo da técnica descrita por Yi-Meng Yen e Steadman (2003) onde os mesmos indicam que as perfurações sejam realizadas através de furadores cônicos associado a batidas com martelo ortopédico. No presente estudo, o acesso à medula óssea foi comprovado por meio do surgimento de glóbulos de gordura no sítio de perfuração, induzindo a migração de células progenitoras para o foco da lesão.

O modelo experimental utilizado para indução de osteoartrite foi considerado adequado, devido à inflamação, efusão articular e degeneração da cartilagem articular, sendo estes achados descritos por McIlwraith (2005). No presente estudo optou-se por induzir a lesão condral na tróclea lateral, o que difere dos demais pesquisas utilizando equinos, onde é realizada a lesão no côndilo medial, visando mimetizar lesões frequentemente visualizadas em humanos (Frisbie et al., 1999). O intuito de realizar a lesão na tróclea lateral distal teve como objetivo facilitar o acesso para artrotomia e biópsia. O acesso à tróclea lateral foi possível em todos animais, tanto para indução da lesão, quanto para artrotomia. Mais além, todos os equinos se recuperaram sem complicações de ambas as cirurgias e em momento nenhum apresentaram seu bem-estar comprometido. Por tais razões, o modelo experimental de defeito osteocondral utilizando a tróclea lateral do fêmur foi satisfatório.

Entretanto há de se ressaltar que houve aumento do diâmetro da lesão condral em alguns animais, o que é incomum quando lesão semelhante é realizada no côndilo medial (Yamada et al., 2011; McIlwraith et al., 2011). Expansão da lesão também foi relatada em um modelo de lesão condral no terceiro osso carpiano, local onde havia pouca sustentação do peso corporal (Hurtig, 1988). A cartilagem articular além de apresentar particularidades quanto à regeneração devido à falta de suprimento sanguíneo, o local e tamanho da lesão influencia no processo cicatricial, forças de compressão e a movimentação articular contribuem para o fluxo de solutos, necessários para a reparação da cartilagem articular (Hurtig, 1988).

6.3. AVALIAÇÃO DE CLAUDICAÇÃO

Como descrito por outros autores, que utilizaram modelos semelhantes de lesão condral, a claudicação era esperada no presente estudo. McIlwraith et al., (2009) utilizando lesão de 1 cm² no côndilo medial do fêmur de equinos obtiveram valores médios (1.3±0.08), em vista disso os valores foram equivalentes aos encontrados no atual estudo. Frisbie et al (2008), após induzir lesão condral de 15mm sobre a crista troclear medial, também obtiveram graus de claudicação semelhante aos encontrados neste estudo.

Como foi descrito anteriormente, os diferentes locais de lesão condral na articulação femurotibiopatelar, mostraram-se semelhantes quanto ao grau de dor, desta forma sugere-se que a mesma tem maior influência em virtude da exposição do osso subcondral, pois este é inervado, diferentemente da cartilagem articular, e por causa do processo inflamatório instalado na articulação onde ocorre a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico, que por sua vez sensibilizam as fibras nervosas aferentes (Werren e Grauw, 2010).

Referente à rotação do membro quando os animais eram submetidos ao trote, este achado foi semelhante ao encontrado por Yamada et al., (2011). Sugere-se que é uma adaptação postural ocasionada pela dor. E como não houve diferença entre as articulações, é possível inferir que a

melhora gradual da claudicação foi ocasionada pela redução do processo inflamatório e não pelo efeito da cartogenina. Diferindo do que foi encontrado com o uso de cartogenina em um modelo de osteoartrite em ratos (Johnson et al., 2012), a articulação que recebeu a molécula não apresentou melhor sustentação do peso comparado com a articulação controle.

6.4. ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL

Em alguns momentos no transcorrer do experimento, as amostras de líquido sinovial apresentaram coloração avermelhada, decorrente da contaminação por sangue no momento da coleta. E, principalmente na terceira semana, algumas coletas de líquido sinovial foram improdutivas. Contaminação por sangue e coleta improdutiva também foram observadas por Martins et al. (2007), Stell et al. (2008) e Yamada et al. (2011). Segundo Barnabé et al. (2005), é comum a ruptura de capilares da membrana sinovial durante a coleta e essa pôde ser confirmada pela inexistência de amostras com coloração alterada no início da punção e coloração amarelo claro após sua centrifugação, ou seja ausência de xantocromia.

A avaliação do teste de coágulo de mucina demonstrou queda da viscosidade (apesar de sem diferença estatística), a partir da segunda semana decorrente do processo inflamatório ocasionado pelo procedimento cirúrgico. Segundo Sugiuchi et al., (2005), na presença de inflamação as enzimas no líquido sinovial quebram a molécula de hialuronato levando a redução da viscosidade. A redução da qualidade do coágulo de mucina deve vir acompanhada do aumento na contagem global de células, acima de 500 mm³ (Stell, 2008), condizendo com os achados encontrados na segunda semana pós-operatório.

O trauma articular está dentre diversos fatores que promovem o aumento da proteína no líquido sinovial (Stell, 2008). Neste experimento, a lesão induzida na cartilagem articular ocasionou aumento na concentração de proteína a partir da segunda semana, perdurando até última análise. A continuidade dos valores elevados de proteína e fibrinogênio, também foi descrito por Frisbie et al., (2009) e Yamada et al., (2011), sendo que os últimos utilizaram plasma rico em plaquetas e células tronco mesenquimais na reparação de lesões condrais induzidas em equinos. Nossos resultados mostram que o tratamento estabelecido não reduziu a inflamação no espaço articular. Por outro lado, a realização de artrocenteses semanais, para coleta de líquido sinovial, pode ter colaborado para manutenção elevada de indicadores inflamatórios. Os valores de pH no presente estudo se encontraram dentro dos limites encontrados por Fonseca et al., (2009).

Os eritrócitos não são considerados constituintes normais do líquido sinovial, e sua contagem pode variar muito, dependendo da contaminação durante a artrocentese (Mcilwraith & Trotter, 1996). Isso explica a variação da contagem de eritrócitos nos diferentes momentos que foram realizados à coleta de líquido sinovial.

Frisbie et al., (2009) e Yamada et al., (2011) relataram aumento na contagem de células nucleadas após a terapia intra-articular com células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas, os mesmos achados foram encontrados no presente estudo. Sugere-se que a redução da contagem na segunda semana está associada à terapia com a técnica de microfratura, devido à liberação de células tronco mesenquimais para o sítio de lesão, sendo que estas, apresentam efeito imunomodulador, como é descrito por Noth et al., (2008) e como não houve diferença na contagem entre os grupos, não acreditamos que a cartogenina tenha contribuído para esta queda nos valores da segunda semana.

Os valores normais para células mononucleares são descrito como maiores que 80%, sendo estas constituídas de linfócitos, macrófagos e células mesoteliais. No presente estudo não houve redução dos valores dessas, diferentemente de Pozzobon et al (2009), que induziu sinovite em pôneis e observou decréscimo de células mononucleares ocasionado pelo quadro inflamatório. Contudo, valores semelhantes foram encontrados por Yamada, (2011), entre 80% de células mononucleares, aos trinta dias após indução de lesão condral, sendo que posteriormente os valores apresentaram tendência a queda.

McIlwraith e Trotter, (1996) refere valores normais de neutrófilos no líquido sinovial de até 10% e valores superiores sugestivos de inflamação. Diferindo destes dados Fonseca, (2009) que descreve até 36% de neutrófilos como dentro dos valores normais. No presente estudo, os animais apresentaram valores em torno de 10 a 15% em todos os momentos, diferindo dos valores de Pozzobon et al (2009) que encontram valores superiores a 80% em articulações com sinovite induzida.

6.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

No presente estudo o tecido de reparação neoformado é composto predominantemente de fibrocartilagem, o que não diferiu entre as articulações. Esses achados foram semelhantes aos encontrados por outros autores usando modelos semelhantes (Milano et al., 2010; McIlwraith., 2011; Milano., et al 2012). Entretanto, na maioria dessas pesquisas não foi obtido formação de cartilagem hialina, com exceção de McIlwraith (2011), que descreveu dentre seus achados a formação de um tecido com características de cartilagem hialina e quantificou este em 16% após avaliação histomorfométrica do tecido de reparação. No presente estudo foi encontrado em média 17,5% deste tecido o que se assemelha aos resultados alcançados por McIlwraith (2011).

A coloração de azul de toluidina foi utilizada, pois demonstra a presença de glicosaminoglicanos na matriz extracelular, corando-a de azul claro e roxo escuro (metocromasia) os glicosaminoglicanos (Hoeomann et al., 2011). Nos dois grupos houve fraca marcação (azul claro) e não houve metocromasia. Esses achados indicam que houve baixa produção de proteoglicanos, mesmo nas áreas onde houve a formação da matriz com características de cartilagem hialina. Resultados semelhantes foram encontrados por Yamada et al (2011), mas diferiram dos encontrados por McIlwraith et al (2011), onde a associação de células tronco mesenquimais e ácido hialurônico, apresentou maior quantidade de agregan. Inferimos que a baixa concentração de células tronco mesenquimais originadas pela técnica de micro perfuração no presente estudo fratura não alcançou concentrações terapêuticas adequadas a ponto de influenciar a produção de glicosaminoglicanos.

7. CONCLUSÕES

A terapia com cartogenina, segundo protocolo utilizado, não foi eficaz em melhorar a qualidade ou a quantidade de tecido de reparação em lesões osteocondrais induzidas e tratadas com microperfurações na tróclea lateral do fêmur em equinos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de microperfurações de defeitos condrais, segundo o método descrito utilizando o pino de Steiman foi útil e de fácil realização, se mostrando capaz de induzir a formação tecido de reparação com presença de cartilagem hialina. Aos exames macroscópico e histológico, não

foram encontradas evidências de osteonecrose. Tais resultados encorajam a realização de novos estudos com essa técnica.

O modelo de lesão osteocondral na tróclea lateral do fêmur equino permitiu fácil acesso cirúrgico para a realização de biópsias. Mais além, todos animais apresentaram evolução favorável no pós-cirúrgico, sem evidências de comprometimento de seu bem estar. Isso demonstra a utilidade desse modelo, contudo considerou-se que o aumento de área de algumas lesões, quando comparada com estudos que utilizaram o côndilo medial, trouxe dúvidas se no menor contato dessa área com a patela poderia interferir negativamente no processo de reparo da cartilagem.

O lamelótomo de Falcão-Faleiros se mostrou um instrumento eficiente para realização de biópsias de cartilagem articular, produzindo fragmentos de tamanho adequado e preservando a integridade de suas camadas, desde a mais profunda à mais superficial.

O exame ultrassonográfico para mensuração dos recessos lateral e femuropatelar medial se mostrou um método eficaz para quantificar a efusão da articulação femuropatelar em equinos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLANCO, F. J.; GUITIAN, R.; VAZQUES-MARTUL, E. et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. *Arthritis and Rheumatism.*, v. 41, p. 284-289,1998.

BRANDT, K. D.; PAUL D.; ERIC R. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. *Med Clin N Am.*, v.93, p.1-24, 2009.

BRITTBERG, M.; LINDAHL, A.; NILSSON, A. et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.*, v. 331. p. 889-895, 1994.

BUGBEE, W. D.; CONVERY, F. R. Osteochondral allograft transplantation. [*Clin Sports Med.*](#), v. 18, p. 67-75, 1999.

CANTLEY, C. E. L.; FIRTH, E. C.; DELAHUNT, J.W.; PFIEFFER, D.W. THOMPSON, K. G. Naturally occurring osteoarthritis in the metacarpophalangeal joints of wild horses. *Equine Veterinary Journal.*, v. 31, p.73–80, 1999.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. 2^a ed. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Elsevier, 2010. p. 655.

DENOIX, J. M.; COUDRY, V. Diagnosis of femorotibial injuries in horses. *Proceedings Ivis.*, p. 283-289, 2008.

ELGUIZAOU, S. B.; FLANIGAN, D. C. A.; JOSHUA, D. HARRIS, J. D. et al. Proud osteochondral autograft versus synthetic plugs — Contact pressures with cyclical loading in a bovine knee model. *The Knee.*, v. 19, p. 812–817, 2012.

EMMERSON, B. C.; GORTZ S JAMALI, A. A.; CHUNG, C.; AMIEL, D.; BUGBEE, W. D. Fresh osteochondral allografting in the treatment of osteochondritis dissecans of the femoral condyle. *Am J Sports Med.*, v. 35, p. 907-914, 2007.

- FONSECA, A. F.; ZAMBRANO, R. S.; DIAS, G. M. B.; LIMA, E. M. M.; ALVES, G. E. S. & GODOY, R. F. Características físico-químicas e citológicas do líquido sinovial da articulação temporomandibular em equinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.29, p. 829-833, 2009.
- FORTIER, L. A.; SMITH, R. K. W. Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, v. 24, p. 191-201, 2008.
- FRISBIE, D. D. Surgical Treatment of Joint Disease. In: AUER, J. A.; STICK, A.S. 4ed. Equine Surgery, Missouri: Sunders, 2012, p. 1123-1129.
- FRISBIE, D. D., KAWCAK, C. E., TROTTER, G. W., POWERS, B. E., WALTON, R. M. & McILWRAITH, C. W. Effects of triamcinolone acetonide on an in vivo equine osteochondral fragment exercise model. *Equine Veterinary.*, v. 29, p. 349-359, 1997.
- FRISBIE, D. D.; KISIDAY, J. D.; KAWCAK, C. E., et al. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research.*, p. 1675-1680, 2009.
- FRISBIE, D. D.; MORISSET, S. HO, C. P. et al. Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *Am J Sports Med*, v.34, p. 1831-1824, 2006.
- FRISBIE, D. D.; TROTTER, G. W.; POWERS, B. E. et al. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet Surg.*, v.28, p. 242-55, 1999.
- GOLDRING, M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.*, v. 43, p. 1916-1926, 2000.
- GREENFIELD, G. Analytical approach to bone radiology. In: 7 ed. Radiology of Bone Diseases. JB Lippincott, Philadelphia. 1986.
- HANGODY, L.; KISH, G.; KARPATI, Z. et al. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*, v.5. p. 262-267, 1997.
- HOEMANN, C.; KANDEL, R.; ROBERTS, S. et al. International cartilage repair society (ICRS) recommend guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. *Cartilage.*, v. 2, n. 2 p. 153-172, 2011.
- HOWARD, R. D.; MCILWRAITH, C. W. Hyaluronan and its use in the treatment of equine joint disease. In: MCILWRAITH CW, TROTTER GW.ed. Joint disease in the horse. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996, p.257-269.
- HUBBARD, M. J. Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study. *J Bone Joint Surg Br.*, v. 78, p. 217-219. 1996.
- HURTIG, B.; PETER, B. F.; CECIL, E. et al. Effects of Lesion Size and Location on Equine Articular Cartilage Repair Mark. *Can J Vet Res.*, v. 52, p. 137-146, 1988.

- JOHNSON, K.; ZHU S.; TREMBLAY, M. S. et al. A Stem Cell-based Approach to Cartilage Repair. *Science.*, v. 336, p. 717–721, 2012.
- JOSHI, N.; REVERTE-VINAIXA, M.; DÍAZ-FERREIRO, E. W.; DOMÍNGUEZ-ORONÓZ, R. Synthetic Resorbable Scaffolds for the Treatment of Isolated Patellofemoral Cartilage Defects in Young Patients: Magnetic Resonance Imaging and Clinical Evaluation. *Am J Sports Med.*, v. 40, p. 1289-1295, 2012.
- KELSER, R. A, CALLENDER, G. R. Equine degenerative arthritis. *Vet Med.*, v.38, p. 307, 1938.
- KIM, D.Y.; TAYLOR, H.W.; MOORE, R.M. et al. Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis. *The Veterinary Journal.*, v. 166, p. 52-57, 2003.
- LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Rheumatology.*, v. 15, p. 628–633, 2003.
- MANKIN, H. I: The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. *N Engl J Med.*, v. 291, p. 1285-1292, 1974.
- MARTINS, E. A. N.; SILVA, L. C. C.; BACCARIN, R. Y. A. Evaluation of the synovial fluid of the femuropatellar joint after experimental medial patellar desmotomy in horses. *Ciência Rural.*, v. 37, n. 3, p.784-788, 2007.
- MCILWRAITH, C. W. Diseases of joints, tendons, ligaments, and related structures. In: 5^o .ed. Adams Lameness in horses. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2006. p.459.
- MCILWRAITH, C. W. Osteoarthritis (Degenerative Joint Disease) - An Update. Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association, Guarujá, SP, Brazil, p. 1-5, 2009.
- MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE D. D.; RODKEY W.G, et al. Evaluation of Intra Articular Mesenchymal Stem Cells to Augment Healing of Microfractured Chondral Defects. *Arthroscopic.*, v. 27, n. 11, p. 1552-1561, 2011.
- MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. Clinical features and diagnosis of equine joint disease. In: 1 ed. *Joint disease in the horse*. Philadelphia: Saunders, 1996, p.120-144.
- MCILWRAITH, C. W. Doença das articulações, tendões, ligamentos e estruturas relacionadas. In: STASHAK, T. S. 5 ed. *Claudicação em equinos*. São Paulo: Roca, 2006, p. 417-437.
- MCILWRAITH, C. W. From arthroscopy to gene therapy: 30 years of looking in joints. *Am Assoc Equine Pract.*, v. 51, p. 65–113, 2005.
- MCILWRAITH, C.W. General pathobiology of the joint and response to injury. In: MCILWRAITH C.W, TROTTER G.W. eds. *Joint disease in the horse*. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 40-70.

- MILANO, G.; DERIU L.; SANNA PASSINO, E. et al. Repeated platelet concentrate injections enhance reparative response of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: An experimental study in an animal model. *Arthroscopy.*, v. 28, n. 5, p. 688-701, 2012.
- MILANO, G.; DERIU L.; SANNA PASSINO, E. et al. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis and Cartilage.*, v. 8, p. 971-980, 2010.
- MILLER, B. S.; STEADMAN, J. R.; BRIGGS, K. K. et al. Patient satisfaction and outcome after microfracture of the degenerative knee. *J Knee Surg.*, v. 17, p. 13-17, 2004.
- NIXON, A. J. Articular cartilage surface structure and function. *Equine Vet Educ.*, v. 3. p. 72-75, 1991.
- NOTH, F.; STEINERT, A. F.; TUAN, R. S. Technology Insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol.*, v. 4, n.7, p. 371-380, 2008.
- PALMER, J. L.; BERTONE, A. L. Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Veterinary Journal.*, v.26, n.4, p.263-277, 1994.
- PARRY, B. W. Miscellaneous laboratory techniques. In: PRATT, P. W. Laboratory procedures for veterinary technicians. St. Louis: Mosby, 1997.p.561-626.
- PEARCE, S. G.; HURTIG, M. B.; CLARNETTE. R. et al. An Investigation of 2 Techniques for Optimizing Joint Surface Congruency Using Multiple Cylindrical Osteochondral Autografts. *Arthroscopy.*, v. 17, p. 50-55, 2001.
- POZZOBON, R.; BRASS K. E.; FIGUEIRA R. A.; DE LA CORTE, F. D. Características físico-químicas e citológicas do líquido sinovial de pôneis com modelo de sinovite induzida. *Ciência Animal Brasileira.*, v. 10, n. 4, p. 1303-1309, 2009.
- PRIDIE, K. H. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Br.*, v. 41 p. 9-618, 1959.
- SANDOVAL, J. A.; LÓPEZ, C.; JU CARMONA, J. U. Therapies intended for joint regeneration in the horse. *Arch Med Vet.*, v. 45, p. 229-236, 2013.
- SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROLL, W. J. Veterinary hematology. 3ed. Philadelphia, Lea & Febiger 1975. p.807.
- STEADMAN, J. R.; BRIGGS, K. K.; RODRIGO, J. J. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy.*, v. 19, p. 84- 477, 2003.
- STEADMAN, J. R.; RODKEY W. G.; BRIGGS K. K. et al. The microfracture: Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Op Tech Orthop.*, v. 7, p. 300-304, 1997.
- STELL, C. M. Equine synovial fluid analysis. *Vet Clin Equine.*, v. 24, p. 437-454, 2008.

SUTTON, S.; CLUTTERBUCK, A.; HARRIS, P. et al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J.*, v. 179, p. 10-24, 2009.

SWIDERSKI, C E.; COOKE, E.; LINFORD R. How to inject the medial femorotibial joint: An alternate approach. In *Proceedings. Am Assoc Equine Prac.*, v.51, 2005.

TROTTER, G. W. Polysulfated glycosaminoglycan (Adequan®). In: McIlwraith, C. W, Trotter, G. W. *Joint disease in the horse*. Philadelphia: W.B. 1^a ed. Saunders, 1996, p. 270–280.

TUMALO, R.; BRAMLAGE, L.; GABEL, A. Sequential clinical and synovial fluid changes associated with acute infectious arthritis in the horse. *Equine Vet J.*, v.21, p. 325–31. 1989.

WEEREN, P. R.; GRAUW, J. C. Pain in osteoarthritis. *Vet Clin Equine*, v. 26, p. 619-642, 2010.

XU; SHEN, Y. D.; SHI, D.; JIANG, Q. Full-Thickness Cartilage Defects Repair With Microfracture Technique and Intra- Articular Injection of A Small Molecule Compound Kartogenin. *Sports Med. and Adult Reconstruction, Abstracts.*, v. 22, p. 482, 2014.

YAMADA, A. L. M. Efeito do Implante Autólogo de Plasma Rico em Plaquetas e Células Tronco Mesenquimais na Reparação de Lesões Condrais Articulares Induzidas Experimentalmente em Equinos. 2011.145f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Júlio de Mesquita Filho. Botucatu.

YI-MENG; YEN, M. D.; STEADMAN, J. R. Microfracture for Osteochondritis Dissecans Lesions. *Oper Tech Sports Med.* v. 16, p. 77-80, 2008.