

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Grasiela De Bastiani

**CARACTERIZAÇÃO RADIOLÓGICA, ULTRASSONOGRÁFICA E
ANATOMOPATOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO METARCARPO
FALANGEANA E LIGAMENTO SUSPENSÓRIO EQUINO**

**Santa Maria, RS
2017**

Grasiela Rossi De Bastiani

**CARACTERIZAÇÃO RADIOLÓGICA, ULTRASSONOGRÁFICA E
ANATOMOPATOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA E
LIGAMENTO SUSPENSÓRIO EQUINO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. PhD. Flávio Desessards De La Corte

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

De Bastiani, Grasiela
Caracterização radiológica, ultrassonográfica e anatomopatológica da articulação metacarpo falangeana e ligamento suspensório equino / Grasiela De Bastiani.- 2017.

86 f.; 30 cm

Orientador: Flávio Desessards De La Corte
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2017

1. Articulação metacarpofalangeana 2. Ligamento suspensório 3. Ultrassom 4. Radiografia. Macroscopia 5. Histologia. Histoquímica I. De La Corte, Flávio Desessards II. Título.

Grasiela Rossi De Bastiani

**CARACTERIZAÇÃO RADIOLÓGICA, ULTRASSONOGRÁFICA E
ANATOMOPATOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO
METACARPOFALANGEANA E LIGAMENTO SUSPENSÓRIO EQUINO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 11 de dezembro de 2017:

Flávio Desessards De La Corte, PhD (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Glaucia Denise Kommers, PhD (UFSM)

Marcos da Silva Azevedo, Dr. (UNIPAMPA)

Maria Elisa Trost, Dra. (UNIPAMPA)

Ricardo Pozzobon, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Com todo o meu amor e carinho agradeço a minha família meu maior exemplo, meu porto seguro. Aos pais meus maiores incentivadores que sempre embarcaram em meus projetos dedicando a mim toda a paciência e apoio necessário.

Ao meu orientador Flavio De La Côte que sempre acreditou e me impulsionou a fazer cada dia um pouco mais e melhor. Que se tornou um pai pelos “puxões de orelha” e orientações e acima de tudo pela amizade. Meu muito obrigado chefe por ter acreditado em mim e, por ter me apresentado novas oportunidades. Nosso exemplo de profissional, nós, os teus orientados trabalhamos todos os dias para que consigamos nos parecer um pouco a ti.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária e sua equipe em especial a minha coorientadora Glaucia que a ela guardo um carinho enorme e uma admiração sem fronteiras. Que sempre me recebeu com seu entusiasmo, mas acima de tudo, com suas palavras amigas e confortantes.

À Equipe da Clínica Hípica em especial, ao Doutor Jarbas que, pertence a este projeto como o maior incentivador e entusiasta. Que nos deixou o maior exemplo de profissionalismo e muita saúde.

Às professoras Karin e Mara por todo o apoio e amizade.

Aos meus nobres colegas que tenho uma grande admiração e adoração, Roberta, Marcos, Camila e Taiara o meu maior presente de amizade e coleguismo.

À nossa equipe Medicina Equina UFSM Gabi, Stefano e Alcemar por todo apoio, mates, risadas, amizade e companheirismo.

Às minhas fiéis escudeiras, irmãs de coração Ana Luiza, Carol e Jojo por toda energia e pensamentos positivos, pela paciência, pelo mate e vinho amigo de sempre.

Às minhas mães emprestadas Neyt, Meri e ao tio Nelci por todo apoio, pela acolhida, pelos abraços, pela cama quentinha e pela comida maravilhosa. A vocês meu muito obrigada que foram muito importantes para que eu conseguisse finalizar esta etapa.

Ao meu amigo e colega Renato Duarte Icart e sua família por todo apoio, acolhida e incentivo.

À secretária do PPGMV, nossa Maria, que sempre me ajudou com muito carinho, meu muito obrigado.

Muito Obrigada.

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo
y no en el resultado.

Um esfuerzo total es una victoria completa (Mahatma Gandhi)

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO RADIOLÓGICA, ULTRASSONOGRÁFICA E ANATOMOPATOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA E LIGAMENTO SUSPENSÓRIO EQUINO

AUTORA: Grasiela Rossi De Bastiani

ORIENTADOR: Flávio Desessards De La Corte

A tese foi desenvolvida sob a forma de quatro manuscritos abrangendo a articulação metacarpofalangeana e o ligamento suspensório equino. Foram selecionados 131 espécimes de membro torácico distal e 11 de membro pélvico distal de equinos com idade média de 5,7 anos oriundos de uma clínica privada, de um frigorífico da região sul do Brasil e/ou destinados ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM que, morreram por diferentes causas. Destes, 30 (22,9%) espécimes não apresentaram alterações na articulação metacarpofalangeana, 30 (22,9%) apresentaram alterações radiográficas, ultrassonográficas e anatomopatológicas do côndilo do terceiro metacarpiano e seus ligamentos colaterais. Para a caracterização ultrassonográfica, macroscópica e histológica da inserção proximal do ligamento suspensório foram selecionados 45 espécimes (34,3%) membros torácicos e pélvicos de animais da raça Crioulo e Puro Sangue Inglês (PSI). Além disso, 37 (28,2%) espécimes foram submetidos a avaliação histoquímica de tendões, ligamentos e cartilagem articular. Observou-se a relação entre a degeneração da cartilagem articular do côndilo do III metacarpiano com entesopatias de ligamentos colaterais da articulação metacarpofalangeana. Achados ultrassonográficos e morfológicos identificaram a diferença entre os componentes da inserção proximal do ligamento suspensório entre a Raça Crioulo e a Raça PSI. Além disso, caracterizou-se o processo cicatricial de tendões, ligamentos e cartilagem articular por meio das técnicas de histoquímica. De forma semelhante, a sensibilidade das técnicas ultrassonográfica ($r^2=0,69$; $p<0,001$) foi correlacionada com a avaliação macroscópica. Os aspectos macroscópicos e histológicos do tecido tendinoso, ligamentar e articular, bem como as suas alterações em relação ao tamanho, forma, arquitetura e ecogenicidade da articulação metacarpofalangeana e da inserção proximal do ligamento suspensório serviram como base para a interpretação correta das técnicas de diagnóstico por imagem.

Palavras-chave: Articulação metacarpofalangeana. Ligamento suspensório. Ultrassom. Radiografia. Macroscopia. Histologia. Histoquímica.

ABSTRACT

RADIOLOGICAL, ULTRASONOGRAPHIC, ANATOMOPATHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE METACARPOPHALANGEAL JOINT AND SUSPENSORY LIGAMENT EQUINE

AUTHOR: Grasiela Rossi De Bastiani
ADVISOR: Flávio Desessards De La Corte

The thesis was developed in the form of four manuscripts covering the metacarpophalangeal joint insertion of the suspensory ligament. A total of 131 specimens of thoracic distal limbs and 11 distal pelvic limbs were selected from horses with a mean age of 5.7 years old from a private clinic and/or assigned to the UFSM Veterinary Pathology Laboratory, who died due to different causes. Of these, 30 (22,9%) specimens showed no alterations in the metacarpophalangeal joint, 30 (22,9%) presented radiographic, ultrasonographic and anatomopathological alterations of the third metacarpal condyle and its collateral ligaments and the proximal insertion of the suspensory ligament of 45 (34,3%) thoracic and pelvic limbs of Crioulo and Thoroughbred. In addition, 37 (28,2%) specimens were submitted to histochemical evaluation of tendons, ligaments and articular cartilage. The relationship between the degeneration of the articular cartilage of the third metacarpal condyle and the collateral ligament collapses of the metacarpophalangeal joint was observed ($r^2=0,69$; $p<0,001$). Ultrasonographic and morphological findings identified the difference between the components of the proximal insertion of the suspensory ligament between the Criollo breed and the Thoroughbred breed. In addition, the scarring process of tendons, ligaments and articular cartilage was characterized by histochemistry techniques. Similarly, the sensitivity of the ultrasound and radiographic techniques were correlated with the macroscopic technique. The macroscopic and histological aspects of the tendon, ligament and articular tissue as well as its alterations in relation to the size, shape, architecture, and echogenicity of the metacarpophalangeal joint and the proximal insertion of the suspensory ligament served as a basis for the correct interpretation of the diagnostic techniques by image.

Keywords: Metacarpophalangeal joint. Suspensory ligament. Ultrasound. Radiography. Macroscopy. Histology. Histochemistry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. ANATOMIA E HISTOMORFOLOGIA DA ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA EQUINA	12
2.2. ULTRASSONOGRAFIA DA ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA EQUINA	13
2.3. ALTERAÇÕES DA ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA	14
2.4. ANATOMIA DA INSERÇÃO PROXIMAL DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO.....	16
2.5. ULTRASSONOGRAFIA DA INSERÇÃO PROXIMAL DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO.....	16
2.6. ALTERAÇÕES DA INSERÇÃO PROXIMAL DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO	17
2.7. MORFOLOGIA DAS ALTERAÇÕES TENDINOSAS, LIGAMENTARES E CARTILAGEM ARTICULAR DE EQUINOS	18
3. ARTIGO 1.....	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS.....	27
4. ARTIGO 2.....	34
INTRODUÇÃO	36
MATERIAIS E MÉTODOS	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	41
5. ARTIGO 3.....	49
INTRODUÇÃO	51
MATERIAIS E MÉTODOS	52
RESULTADOS	53

DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56
6 ARTIGO 4.....	61
6. DISCUSSÃO	77
8. CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

A utilização dos equinos em atividades esportivas exigiu uma adaptação biomecânica de suas articulações, tendões e ligamentos, tornando-os assim atletas completos (HILL, 2003). Em um estudo realizado por Stover & Murray (2008), observou-se que as lesões musculoesqueléticas foram responsáveis pela eutanásia ou morte de 80% dos equinos no estado da Califórnia, sendo as principais causas de queda de desempenho e retirada dos equinos das provas de competição em todo o mundo (DYSON et al., 2008). Logo, é compreensível que lesões do sistema musculoesquelético, tais como tendinopatias e desmopatias, sejam comuns na rotina do cavalo atleta (ROSS & DYSON, 2003), exigindo de 9-18 semanas de terapia e reabilitação em casos mais severos (O'MEARA et al., 2010). Esta longa fase de reabilitação possivelmente ocorre devido à capacidade limitada de cicatrização do tecido tendinoso, associado ao fato que, o tecido formado durante o processo de reparação tecidual é biomecanicamente inferior ao tecido original. Esses dois fatores podem fazer com que as taxas de recorrência destas lesões cheguem a até 30% (PATTERSON-KANE & FITH, 2009).

Tendões e ligamentos parecem ser capazes de responder ao exercício durante o crescimento e esta resposta é muito importante no desenvolvimento e composição da matriz tendinosa e ligamentar de animais jovens e adultos (SMITH & GOODSHIP, 2008). O exercício de galope pode resultar em microtraumas no centro dos tendões (PATTERSON-KANE et al., 1997) e o acúmulo desses microtraumas, produzidos pelo exercício físico, pode enfraquecer o tendão, resultando na sua ruptura parcial ou completa, normalmente acompanhada de sinais clínicos (DIAMANT et al., 1972). Estresses biomecânicos, segundo Webbon (1997), podem alterar o suprimento vascular de tendões e são considerados a causa primária de lesões tendinosas, sendo que essas ocorrem com maior frequência em cavalos atletas e estão localizadas, em sua maioria, nos membros torácicos (HALPER et al., 2011). Devido à incessante busca em manter as propriedades biomecânicas dos tecidos tendinosos e ligamentares similares ao tecido original após o acometimento de lesões, o presente estudo teve por objetivo inicial detalhar a descrição da composição tecidual relacionada a estágios iniciais e avançados do processo cicatricial que, por meio das técnicas de histoquímica pode determinar o tipo de colágeno, tecido de substituição e alterações vasculares observados nos mesmos. Contribuindo desta forma com informações relevantes para novas pesquisas que possam atuar no processo de diferenciação do tecido cicatricial e ou, substituição e seus componentes presentes em tendões e ligamentos após processo de reparação tecidual.

O trauma decorrente do exercício físico como descrito anteriormente também é responsabilizado por sobrecarregar as articulações, levando a esclerose óssea subcondral e remodelação articular, a fim de aumentar sua resistência. No entanto, isso resulta na diminuição da capacidade do osso subcondral de absorver o impacto e, por sua vez, coloca mais tensão sobre a cartilagem articular, favorecendo que alterações estruturais como falha nas pontes de colágeno, fibrilação e colapso da cartilagem articular ocorram na superfície articular (RADIN et al., 1991). Segundo Cantley et al. (1999), o desenvolvimento de osteoartrite em cavalos selvagens é atribuído à ocorrência natural associada à idade. Gelber et al. (2000) acrescenta que os traumas articulares esportivos e outras agressões podem provocar degeneração cartilaginosa em decorrência de processos inflamatórios intra-articulares e por estas razões aumentam significativamente os riscos para o desenvolvimento de osteoartrite. Tem-se por objetivo no presente estudo identificar a possível relação existente entre as degenerações cartilaginosas na face dorsal da articulação metacarpofalangeana (MF) e as entesopatias dos ligamentos colaterais (LC) desta articulação, ressaltando desta forma a utilização de técnicas de diagnóstico que possibilitam uma detecção precoce de lesões cartilaginosas e ligamentares tornando-se extremamente importantes na rotina de avaliação clínica do cavalo atleta, permitindo desta forma, o tratamento precoce e subsequente mitigação dos danos articulares e ligamentares.

O presente estudo também almeja caracterizar a inserção proximal do ligamento suspensório (IPLS) em cavalos da raça Crioulo que foram comparados a cavalos da raça Puro Sangue Inglês, afim de identificar diferenças entre forma, tamanho e composição tecidual do mesmo facilitando a sua interpretação ultrassonográfica. Adicionalmente também é descrita as técnicas de histoquímica aplicadas a amostras tendão flexor digital profundo (TFDP), tendão flexor digital superficial (TFDS) e ligamento anular palmar (LAP), servindo esses achados para o entendimento da composição e organização do tecido cicatricial e ou, de substituição.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANATOMIA E HISTOMORFOLOGIA DA ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA EQUINA

A articulação metacarpo/metatarso falangeana pode ser caracterizada como um sistema de amortecimento de impacto, armazenamento de energia e um estabilizador do da porção distal do membro (CLAYTON et al., 1998; COLBORNE et al., 1998). Funcionalmente, a articulação metacarpo/metatarsofalangeana é especializada na realização de movimentos de flexão e extensão, no plano sagital, devido à forma condilar do terceiro metacarpiano/metatarsiano (MCIII/MTIII), a presença de uma proeminente crista sagital e a força congruente dos ligamentos que a cercam (BARONE, 1989). O aparelho suspensório do boleto, compreendido pelo ligamento suspensório (LS) ou músculo interósseo III e ossos sesamoides proximais, tem um importante papel na biomecânica desta articulação, sendo o responsável por manter a suspensão da articulação MF durante o passo (COHEN et al., 1999).

A articulação MF é submetida à alta tensão biomecânica durante a locomoção, especialmente durante a parte intermediária da fase de apoio, quando ossos e tecidos moles que a compõem sofrem extrema tensão. Esse estresse é considerado como um dos principais responsáveis pelo aparecimento de lesões que envolvem as diferentes estruturas desta articulação e aparelho suspensório (DENOIX et al., 1993). Esta possui no aspecto dorsal uma espessa cápsula que mede aproximadamente 1 mm e, distalmente 0,5 mm, e um recesso dorsal fibroso no aspecto dorsal proximal que contém pouco líquido sinovial em articulações sadias e outro recesso palmar proximal com inúmeras vilosidades sinoviais (DENOIX, 2009).

Histologicamente a cartilagem articular de cavalos adultos é dividida em três camadas, superficial, intermediária e profunda. A camada superficial ou tangencial contém condrócitos achatados ou ovoides e as fibras de colágeno em orientação tangencial. Na camada intermediária ou de transição, os condrócitos possuem dimensões maiores e as fibras de colágeno únicas ou em conjunto estão ordenadas aleatoriamente. Já na camada profunda ou radial, os condrócitos estão dispostos em colunas verticais separadas por fibras de colágeno com um arranjo radial (McILWRAITH, 2001).

Os ligamentos contêm 85% de colágeno tipo I presente no tecido conectivo e quantidades menores dos tipos III e V (AMIEL et al., 1984). Os ligamentos colaterais (LC) medial e lateral são compostos de uma parte superficial e profunda. A parte superficial se origina proximal, no aspecto distal do metacarpo, e segue distalmente se inserindo no aspecto

proximal lateral/medial da primeira falange. A parte profunda é triangular e se origina na fossa condilar abaxial, percorrendo oblíquamente na direção palmar/distal e se inserindo na primeira falange e nos ossos sesamoides (VANDERPERREN et al., 2008). Pohlin et al. (2014) descreve que, as fibras profundas se entrecruzam com o ligamento sesamoideano colateral, com origem no aspecto palmarolateral/palmaromedial do osso sesamoideano proximal que, por sua vez, se insere na fossa condilar do metacarpiano III. A principal função dos mesmos segundo Barone (1989) é de limitar o movimento da articulação MF no plano sagital e na sua suspensão.

2.2. ULTRASSONOGRAFIA DA ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA EQUINA

Em secções ultrassonográficas longitudinais e transversais da face dorsal da articulação MF a cápsula articular ecogênica está localizada entre os hipocogênicos tendões extensores dorsal e lateral, e se encontra separada do hiperecogênico osso subcondral do MCIII por uma fina membrana sinovial hipocogênica e pela cartilagem articular caracterizada por uma linha regular anecóica (DENOIX et al., 1996). As principais limitações da ultrassonografia da articulação MF descritas por Denoix & Audigie (2001) são a dificuldade de produzir imagens da superfície articular proximal da primeira falange e da superfície articular palmar/plantar do MCIII e MTIII devido a limitação na flexão e exposição das superfícies.

Achados ultrassonográficos anormais de cápsulas articulares incluem modificações na espessura, ecogenicidade e alterações em suas inserções ósseas (DENOIX et al., 1995). O espessamento da cápsula articular é um achado comum. Imagens hipocogênicas podem ser identificadas além do aumento de espessura da cápsula. Geralmente, cápsulas articulares possuem uma forma assimétrica bem como no seu aspecto lateral e medial e são localizadas no aspecto dorsolateral ou dorsomedial da crista sagital do côndilo MCIII (DENOIX et al., 1996). Em contrapartida, achados como a diminuição na espessura da cartilagem articular é indicativa de fibrilação da mesma devido ao fato de que, a degeneração cartilaginosa induz a perda focal ou difusa de sua espessura. Em secções transversais, irregularidades da superfície articular podem ser produzidas por erosões cartilaginosas lineares dos côndilos metacarpianos (DENOIX, 2009).

Ultrassonograficamente, as fibras da porção superficial dos LC são ecogênicas e dispostas vertical e paralelamente em relação à pele. O LC superficial se estende no sentido

proximodistal, perpendicular à superfície dos côndilos do MCIII e são facilmente examinadas no plano ultrassonográfico longitudinal. Já a avaliação da porção profunda exige o posicionamento correto do transdutor na fossa condilar do MCIII devido à disposição oblíqua de suas fibras e a sua orientação no plano dorsoproximal e palmarodistal. As fibras da porção profunda se apresentam hipoecogênicas em relação à porção superficial (DENOIX et al., 1996). Esses ligamentos são examinados de forma independente porque estão em planos diferentes, conforme Reef (1998). Ligamentos saudáveis têm uma aparência ecogênica (DENOIX, 2009).

Na avaliação ultrassonográfica de LC da articulação MF deve-se observar a presença de envolvimento articular com base na formação de entesófitos que podem ser osteófitos marginais e, a formação de entesófitos presos a cápsula articular, achados compatíveis com osteoartrite da articulação MF. Esclerose subcondral, defeitos radioluscentes e degeneração cartilaginosa ainda podem ser extensos com evidência radiográfica mínima de formação de osteófitos (ROSS, 1998). A degeneração da cartilagem é caracterizada por redução do espaço anecóico, que representa tecido cartilaginoso, associado a irregularidades da superfície óssea do côndilo do MCIII em seções ultrassonográficas transversais, sem obrigatoriamente apresentar formação de entesófitos (DE BASTIANI et al., 2014).

É importante salientar que, a articulação MF deve ser mantida em flexão para o sucesso da avaliação ultrassonográfica, pois isto aumenta consideravelmente a exposição da superfície subcondral, permitindo a avaliação completa de lesões ósseas subcondrais (DENOIX, 2009). A técnica ultrassonográfica demonstra ser superior à radiológica na detecção de fragmentos na face óssea dorsal da articulação que se apresentam hiperecogênicos e produzem uma sombra acústica distal subjacente à superfície óssea (PARMAR et al., 2010).

2.3 ALTERAÇÕES DA ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA

Em decorrência da biomecânica da articulação MF, a fragmentação osteocondral é uma consequência da agressão articular, frequentemente relatada em animais de corrida, sendo a sintomatologia clínica manifestada pela claudicação severa do membro afetado associada à efusão sinovial, segundo Kawcak & McIlraith (1994).

Um estudo realizado por Declercq et al. (2009) descreve que os danos articulares da articulação metacarpo (tarso) falangeana estariam associados a eventos traumáticos individuais ou a microlesões provocadas pela pressão suportada pela própria articulação.

Murray et al. (1998) descreveram a fibrilação da cartilagem articular associada a perda de proteoglicanos identificados em um estudo realizado no terceiro osso cuboidal de equinos que seguiam uma intensa atividade atlética. A fibrilação da cartilagem articular é caracterizada por fissuras e pode estar associado a erosões articulares que predisõem à formação de osteófitos marginais (ISAAC et al., 2010). A formação dos osteófitos provavelmente está associada à instabilidade articular e a sua identificação radiográfica pode levar semanas ou meses (MOSKOWITZ & GOLDEBERG, 1987; KIDD et al., 2001). Segundo Vanderperren et al. (2011), osteófitos marginais são frequentemente observados na superfície óssea lateral e ou medial, combinados a fissuras do osso subcondral.

Em modelos experimentais de osteoartrite foi observado que o trauma ocasionado pelo impacto articular está associado à degradação da cartilagem hialina (THOMPSON et al., 1991). Em consonância com investigações anteriores relacionadas à ocorrência natural de osteoartrite foram também observadas fissuras na cartilagem articular amplamente identificadas no côndilo palmar do MCIII (NORRDIN & STOVER, 2006). Combinados, estes estudos sugerem uma ligação entre o dano estrutural da cartilagem articular e a remodelação óssea (LACOURT et al., 2012). De acordo com Vanderperren et al. (2011), na avaliação ultrassonográfica, as articulações podem apresentar diferentes graus de osteoartrite, caracterizados por presença de osteófitos marginais ou de formações ósseas e alterações da superfície do osso subcondral que podem variar, de pequenas fissuras a irregularidades severas. Alterações na linearidade do osso subcondral também podem representar lesões (RELAVE et al., 2009) facilmente diagnosticadas por ultrassonografia como erosões, irregularidades e osteófitos (DENOIX et al., 1996).

Sem menor importância, mas diretamente envolvidas, as estruturas que compõem os tecidos moles da articulação MF estão expostas a instabilidade articular medial ou lateral. E como modalidade de diagnóstico por imagem, a ultrassonografia é mais utilizada para a identificação de alterações de tecidos moles (DENOIX et al., 1996; WITCOMB, 2004).

Em um estudo realizado por King et al. (2013), lesões de LC ocorreram com maior frequência que as lesões subcondrais ou degenerações cartilaginosas em equinos diagnosticados pela técnica radiográfica. Debarainier et al. (2013) descreveu as alterações ultrassonográficas de entesopatias como o espessamento do LC medial e ou lateral, associados ou não a alterações na arquitetura do padrão fibrilar ligamentar, mas em todos os casos foi observada a presença de irregularidades na superfície marginal óssea de inserção. Desmopatias de inserção (entesopatias) possuem achados acompanhados de alterações ósseas, tais como superfície irregular, áreas de osteólise e a presença de entesófitos no local da inserção (DENOIX, 2009).

2.4. ANATOMIA DA INSERÇÃO PROXIMAL DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO

A função principal do LS é evitar que a articulação MF e interfalangeana proximal sofram extensão excessiva sendo que o mesmo é descrito, nos equinos, como à evolução do músculo interósseo III (DENOIX, 1994).

No membro torácico, o LS inicia como uma fina camada de fibras proveniente do aspecto palmar proximal do osso terceiro carpiano e MCIII (WERPY et al., 2013) percorrendo a fileira distal de ossos do carpo sobre o aspecto palmar do MCIII e entre os metacarpianos acessórios II e IV (ALSOOK et al., 2013). Sua aparência bilobada é facilmente identificada na altura de sua fixação no MCIII. Normalmente, o lóbulo medial é mais fino e mais largo que o lóbulo lateral. No membro pélvico o LS possui formato triangular e inicia no aspecto proximal plantar do MTIII estando em íntimo contato com osso quarto metatarsiano e sendo separado do segundo metatarsiano por uma grande quantidade de tecido conjuntivo (WERPY et al., 2013). Segundo Dyson & Genovese (2010), o LS pode ser dividido em três áreas: a origem, o corpo e os ramos.

O LS é descrito por Alsook et al. (2013) como uma estrutura heterogênea composta por tecido conjuntivo denso, com presença de tecido adiposo envolvido pelos fascículos musculares em sua inserção proximal. Anteriormente, Hauser et al. (1984) já descrevia que os tecidos musculares e adiposos existentes no ligamento estão localizados no interior dos fascículos ligamentares intercalando as fibras de colágeno.

2.5. ULTRASSONOGRAFIA DA INSERÇÃO PROXIMAL DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO

A ultrassonografia tem sido a técnica de eleição para avaliação do aspecto proximal ou origem do LS (DYSON, 1991), principalmente pela facilidade de execução e acesso aos equipamentos. No entanto, a avaliação dos aspectos abaxiais do mesmo pode se tornar um desafio dependendo da largura e forma do feixe de ultrassom (BROKKEN et al., 2007; POWELL et al., 2010). Acrescenta a autora que estas variações ultrassonográficas são produzidas devido à composição tecidual única da IPLS como, fibras musculares, fibras colágenas intercaladas pelo tecido adiposo.

Para obtenção da imagem dos lobos medial e lateral da IPLS no membro torácico, a probe deve ser posicionada no aspecto proximopalmar medial e lateral e perpendicular ao axis aproximadamente 5 a 6 cm distal da articulação carpometacarpiana (WERPY et al., 2013).

Para tanto, também serão visualizadas as fibras musculares que possuem menor ecogenicidade quando comparadas as fibras ligamentares, criando uma variação ecogênica considerada normal na IPLS (AGUT et al., 2009). O tecido adiposo sofre alteração no seu padrão de visualização em função do grau de tensão aplicada ao ligamento suspensório, uma vez que esta se apresenta hiperecogênica com o membro torácico flexionado e com ecogenicidade semelhante às fibras ligamentares com o membro em estação (BISCHOFBERGER et al., 2006). No entanto, a diferenciação do tecido adiposo e das fibras musculares pode se tornar confusa devido às mesmas estarem intercaladas no interior da IPLS (SCHARAMME et al., 2012). Dyson (1998) descreve, que estas imagens são produzidas devido à quantidade variável de tecido muscular que podem contribuir na geração de imagens com áreas hipoeecogênicas na sua porção proximal. Esta variação na ecogenicidade da IPLS provocada pelo tecido adiposo e muscular pode resultar em interpretações ultrassonográficas errôneas concluindo como alterações nas áreas que correspondem a composição tecidual normal corrobora a autora. Soffler & Hermanson (2006), caracterizam as fibras musculares do ligamento suspensório como curtas, de aproximadamente um milímetro, agrupadas em feixes musculares pouco definidos medial e lateralmente.

2.6. ALTERAÇÕES DA INSERÇÃO PROXIMAL DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO

As lesões da IPLS são relatadas como causas importantes de claudicações afetando com maior frequência os membros torácicos de equinos de todas as raças (SINGER et al., 2008; SOUZA et al., 2010; WERPY & DENOIX, 2012; WILLIAMS et al., 2013). Estima-se que 14% dos equinos de corrida, em pleno treinamento, possuam lesões no LS do membro torácico (COHEN et al., 1999). Foi pesquisada por Hill et al. (2016) uma população de 327 cadáveres de cavalos de corrida para diagnosticar a prevalência de suas lesões e constataram que, as alterações que se referem aos ramos do ligamento suspensório constituíram 72%, corpo 24,7% e inserção proximal 11,3%. As lesões do aparelho suspensório foram um achado comum de necropsia nos 221 cavalos PSI avaliados no estudo e foram observadas em animais que possuíam uma idade maior que sete anos (HILL et al., 2016).

Na desmíte crônica progressiva do LS em equinos ocorre falha no suporte da articulação MF, pois o processo de reparação tecidual consiste na morte dos desmócitos ou na sua transformação em condrócitos em consequência do isolamento dos feixes de colágeno a partir do fornecimento sanguíneo (WHITE & HEWES, 2008).

Alterações ultrassonográficas associadas à desmites de IPLS no membro torácico incluem: espessamento do ligamento em uma secção transversal, delimitação inexistente dos seus lobos, áreas focais ou difusas de hipocogenicidade, mineralização focal e irregularidades da superfície óssea do córtex palmar do MCIII. Associada a estas observações, são descritas, pela técnica radiográfica, o aumento da opacidade óssea causada pela esclerose das trabéculas do córtex palmar do MCIII no local de inserção do ligamento suspensório (DYSON & GENOVESE, 2011).

As lesões da IPLS podem ser desencadeadas devido a alterações do tecido conjuntivo frente às forças biomecânicas que são aplicadas ao mesmo (SILBERNAGEL et al., 2006). Embora as lesões do LS sejam relativamente bem descritas, são necessários estudos de sua estrutura para melhorar a compreensão de suas propriedades mecânicas especialmente após a ocorrência de uma lesão (ALSOOK et al., 2015). Em virtude das informações citadas buscou-se no presente trabalho esclarecer a composição tecidual da IPLS da raça Crioulo melhorando desta forma a interpretação ultrassonográfica.

2.7. MORFOLOGIA DAS ALTERAÇÕES TENDINOSAS, LIGAMENTARES E CARTILAGEM ARTICULAR DE EQUINOS

Os tendões são compostos de tecido conjuntivo regular denso e rico em colágeno (CALVE et al., 2004), caracterizado por hipovascularização e hipocelularidade, cujo resultado de reparação é pobre (McBRIDE et al., 1985). O processo cicatricial dos tendões passa por três fases, ou seja, inflamação, proliferação e remodelação. Durante a fase inflamatória, os macrófagos liberam fatores de crescimento que induzem a formação da matriz extracelular e a proliferação dos fibroblastos (FUKASAWA et al., 1987). Na fase seguinte ocorre a proliferação das células do epitendão e a sua migração e deposição longitudinal ocorre nas camadas mais superficiais do tendão (LUNDBORG et al., 1985). Também existem evidências de aumento na celularidade do endotendão enquanto ainda ocorre proliferação no epitendão (WIIG et al., 1997).

A neovascularização se caracteriza pela formação de canais vasculares que se estendem no interior da área de reparação do tendão. A angiogênese é acompanhada por proteólise da matriz extracelular e pela invasão de novos vasos para o interior dos tecidos (SATO et al., 2000). A resposta do processo cicatricial demonstra espessamento do paratendão que se desenvolve 3-7 dias após a lesão na superfície do retináculo. Este tecido proliferativo consiste na expressão celular de fatores de transcrição, proteoglicanos como a

fibromodulina, actina alfa e fator de necrose tumoral. Estas células migram para o local do defeito tendinoso pela superfície dorsal ou palmar do tendão (DYMENT et al., 2013).

A degradação das fibras de colágeno é acompanhada por nova deposição de fibras finas de colágeno preenchendo o local de reparação (OSHIRO et al., 2003). A fase de remodelação do tecido tendíneo é um processo lento que visa à formação de uma ferida funcional. Depósitos de colágeno tipo III são lentamente destruídos por colagenólise e substituídos por colágeno tipo I. A mudança celular que ocorre devido ao predomínio de tecido fibroso ocorre nas primeiras semanas da lesão tendínea (BERGLUND et al., 2006). Ressalta Watts et al. (2012) que, os parâmetros histológicos organizacionais considerados em tendinopatias são hiper celularidade, hipervascularização, perda da matriz organizacional e núcleo celular arredondado.

A maioria das alterações histopatológicas descritas por Crisan et al. (2013) na avaliação da inserção final do TFDP incluíram: zonas de necrose central, fibroplasia, fibrose, metaplasia cartilaginosa, associadas a proliferação interfascicular de septos tendinosos e mudanças vasculares no epitendão e no endotendão com neoformação de tecido jovem (CRISAN et al., 2013). A especificidade das lesões tendinosas é considerada consequência de trombose vascular e isquemia (BUSONI et al., 2005). Lesões vasculares são caracterizadas pela liberação do fator VIII pelas células endoteliais (NIEMIR et al., 2004). Oclusões vasculares e neovascularização foram previamente documentadas em equinos com dor crônica de casco associada a lesões do TFDP (BLUNDEN et al., 2006; BLUNDEN et al., 2009).

O tecido fibrocartilaginoso após o processo de reparação tecidual contém pequenas áreas de cartilagem hialina que são caracterizadas por uma matriz basofílica homogênea com células condroides dispersas caracterizando a metaplasia cartilaginosa. As colorações de safranina O e azul alciano confirmam a presença de substrato mucóide e cartilagem hialina (POHLIN et al., 2014). Estas alterações são desencadeadas por uma diferenciação condrogênica e osteogênica errônea devido aos condrócitos e osteoblastos, possuem um efeito negativo sobre o mecanismo de regeneração tecidual (LUI et al., 2012).

Conforme o envelhecimento do tendão, o volume de colágeno e a celularidade dos fibroblastos aumenta, mas o metabolismo celular diminui concomitantemente com a perda de proteoglicanos (VIITAMEN et al., 2003). Proteoglicanos permitem que o feixe de fibras de colágeno possa esticar independente da carga ou movimento, protegendo também os elementos vasculares (VOGEL, 2004). Birch et al. (1999) observaram aumento do teor de colágeno do tipo III com o envelhecimento e diminuição do diâmetro das fibras tendíneas. As mudanças foram atribuídas à organização diferenciada das fibras de colágeno devido ao

estresse e à locomoção. Outros estudos identificaram mudanças degenerativas na zona central dos tendões de cavalos mais velhos relacionados a modificações da matriz celular (PATTERSON-KANE et al., 1997). Por conseguinte, parece razoável formular a hipótese de que uma diminuição no diâmetro das fibras de colágeno pode ser responsável pela diminuição na ecogenicidade dos tendões em cavalos mais velhos (CREVIER-DENOIX et al., 2005).

Os ligamentos são compostos de quase 85% de colágeno do tipo I que proporciona a rigidez e resistência a tração aos tecidos. Outros tipos de colágeno, como os tipos III, V, VI, XI, XII e XIV, são encontrados em menor proporção (HAUSER et al., 2013). Microscopicamente, o LS apresenta um arranjo linear das fibras colágenas, similar aos tendões, com entrada vascular entre as fâscias que circundam os fascículos (DYSON, 2000). Segundo Gartner & Hiatt (1997) ligamentos são compostos por tecido conjuntivo regular denso, onde as fibras de colágeno possuem um arranjo em ondas paralelas.

Achados histológicos da porção superficial e profunda dos LC da articulação MF de membros torácicos, sem apresentar histórico de claudicação prévia e sem alterações ultrassonográficas são caracterizados por desmócitos alongados, embebidos em uma matriz extracelular rica em colágeno dispostos em um arranjo longitudinal. Em contrapartida, alterações histológicas dos LC da articulação MF foram caracterizadas pela presença de áreas hipocelulares com perda de orientação das fibras (POHLIN et al., 2014).

A cartilagem articular é um tecido conectivo flexível composto primariamente por água (68-85% do peso), matriz fibrilar contendo colágeno tipo II (10-20%), proteoglicanos (agrecanase 5-10%) e condrócitos (MOW & RATCLIFFE, 1997). O maior responsável pela propriedade mecânica da cartilagem articular é a agrecanase que, é considerada um proteoglicano responsável por ligações covalentes ao hialuronato (KIDD et al., 2001). O processo de osteoartrite é caracterizado microscopicamente pela perda de proteoglicanos (redução da coloração metacromática em secções histológicas) causada pela degradação enzimática da cartilagem articular (principalmente pela agrecanase e metaloproteinasas). Associado a estes achados também, se observam exposição e calcificação das camadas cartilaginosas, com consequente eburnação da superfície óssea subcondral (KIDD et al., 2001).

Os danos cartilagosos se iniciam pela liberação de citocinas que desencadeiam a degradação de colágeno na matriz cartilaginosa. Com a diminuição do colágeno, a cartilagem perde a sua capacidade de absorção de impacto e o exercício contínuo resulta em traumas constantes e consequentemente insultos à cartilagem (SANTSCHI, 2008).

3. ARTIGO 1

Trabalho aceito para publicação:

Aspectos ultrassonográficos, anatômicos e histológicos normais da articulação metacarpofalangeana equina

**Grasiela De Bastiani, Flavio De La Corte, Glaucia Denise Kommers, Karin Erica Brass,
Roberta Pereira, Camila Cantarelli e Taiara Muller da Silva**

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, 2017

Aspectos ultrassonográficos, anatômicos e histológicos normais da articulação metacarpofalangeana equina¹

Grasiela De Bastiani^{2*}, Flavio De La Corte², Glauca D. Kommers³, Karin E. Brass², Roberta Pereira², Camila Cantarelli² e Taiara M. da Silva³

ABSTRACT.- De Bastiani G., De La Corte F., Kommers G.D., Brass K.E., Pereira R., Cantarelli C. & Silva T.M. 2015. [Normal ultrasonographic, anatomical and histological aspects of the equine metacarpophalangeal joint.] Aspectos ultrassonográficos, anatômicos e histológicos normais da articulação metacarpofalangeana equina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. E-mail: grasibage@hotmail.com.

The purpose of this study was to describe and characterize the equine metacarpophalangeal joint structures through ultrasonographic, anatomical and histological analysis. Seventy forelimb specimens were obtained from a slaughterhouse and submitted to ultrasonographic evaluation. Thirty specimens without ultrasonographic detectable lesions were selected for dissection and subsequent anatomical and histological evaluation. Criteria such as size, shape, architecture and echogenicity were observed in order to characterize normal ligaments, tendons, joint capsule and articular cartilage of the metacarpophalangeal joint.

INDEX TERMS: metacarpophalangeal, joint, images, ultrasound, histology.

RESUMO.- O objetivo deste estudo foi descrever e caracterizar as estruturas que compõem a articulação metacarpofalangeana equina por meio de análise ultrassonográfica, anatômica e histológica. Membros torácicos equinos (=70), obtidos em instalações frigoríficas, foram submetidos a exame ultrassonográfico *post mortem*. Destes, 30 membros apresentaram imagens ultrassonográficas consideradas sem alterações. Posteriormente foi realizada a dissecação dos mesmos e o estudo anátomo-histológico. Critérios como tamanho, forma, arquitetura e ecogenicidade foram observados a fim de caracterizar as imagens ultrassonográficas, anatômicas e histológicas normais das estruturas ligamentares, tendíneas, capsulares e cartilaginosas da articulação metacarpofalangeana equina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: metacarpofalangeana, articulação, imagem, ultrassom, histologia.

INTRODUÇÃO

A articulação metacarpofalangeana (MF) é uma das articulações mais afetadas por lesões traumáticas e degenerativas em equinos e por isso é frequentemente submetida a avaliações radiográficas e ultrassonográficas (Denoix 1996). Funcionalmente, essa articulação é especializada na realização de movimentos de flexão e extensão no plano sagital devido à forma do côndilo do terceiro metacarpiano/metatarsiano, à presença de uma proeminente crista sagital e à força congruente dos ligamentos que a cercam (Barone 1989).

No aspecto dorsal, a articulação MF possui uma cápsula espessa que mede aproximadamente 1mm na sua inserção proximal e 0,5mm na distal. A superfície da cartilagem articular e do osso subcondral pode ser visualizada com o membro na posição vertical, apoiado sobre o solo. Porém, para avaliar a porção distal destas estruturas, se torna necessária a flexão máxima da articulação. Além do ligamento suspensório (LS), ossos sesamoides proximais e ligamento intersesamoideano (LI), esta articulação ainda apresenta dois ligamentos colaterais (LC) simétricos formados por duas camadas, uma

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Clínica de Grandes Animais, Hospital Veterinário Universitário (HVU), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Campus Universitário, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: grasibage@hotmail.com

³ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFSM, Av. Roraima 1000, Campus Universitário, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

superficial ou longa e outra profunda, curta e oblíqua. Ela também possui um recesso proximal dorsal fibroso que contém pouco líquido sinovial em articulações sadias e outro recesso proximal palmar com inúmeras vilosidades sinoviais (Denoix 2009). A face palmar do bolete se caracteriza pelo ligamento anular palmar (LAP)/plantar localizado imediatamente abaixo da pele e tecido subcutâneo. Além disso, as bordas do fino tendão flexor digital superficial (TFDS) estão em estreito contato com o tendão flexor digital profundo (TFDP) oval. Juntamente a eles se observa a manica flexora que desliza em conjunto sobre o scutum proximal composto pelo ligamento intersesamoideano e os dois ossos sesamoides proximais (Seignour et al. 2012).

A ultrassonografia é o principal método amplamente disponível de diagnóstico por imagem para avaliar e diagnosticar lesões de tecidos moles, incluindo a possibilidade ímpar de avaliar enteses. Ela permite o estudo em tempo real e dinâmico avaliando tamanho, arquitetura, forma e ecogenicidade das estruturas (Denoix 2000).

O propósito deste estudo foi descrever e caracterizar as estruturas normais que compõem a articulação MF equina, utilizando a ultrassonografia, anatomia e histologia. Os dados obtidos são fundamentais para a correta interpretação ultrassonográfica de alterações da articulação MF equina.

MATERIAL E MÉTODOS

Setenta espécimes torácicos equinos, direito e esquerdo, desarticulados na articulação intercarpiana foram obtidos em um frigorífico da região sul do Brasil. Destes, 30 foram selecionados por apresentarem imagens ultrassonográficas consideradas normais das articulações MF, bem como por não apresentarem alterações físicas à inspeção e palpação tais como distensão da bainha digital, alterações nos ramos do LS e efusão articular.

Os espécimes torácicos equinos selecionados foram levados ao laboratório da Universidade Federal de Santa Maria, onde foi realizada a tricotomia e a imersão em água morna, que favorece a absorção hídrica pelos tecidos cutâneos, permitindo uma melhor transmissão das ondas ultrassonográficas entre o transdutor e a estrutura a ser examinada. Foi aplicado gel ecográfico sobre a pele em quantidade suficiente para evitar interferências na propagação do som quando o transdutor era colocado sobre a mesma.

Os estudos ultrassonográficos realizados na região MF foram executados com o membro na posição vertical, apoiado sobre o solo e estendido. Imagens ultrassonográficas transversais e longitudinais foram obtidas usando as abordagens palmar, dorsal, palmar oblíqua, dorsomedial e dorsolateral. As imagens foram obtidas utilizando um equipamento de ultrassom portátil (*Myndrai 2200*), equipado com um transdutor linear de 7-10 MHz e um "standoff pad".

Na face dorsal do bolete (Fig.1A) foi realizada uma secção ecográfica transversal para avaliar a metade proximal do côndilo metacarpiano. O transdutor foi deslocado no sentido próximo-distal da metáfise do osso metacarpiano III (McIII) até a falange proximal para observação da inserção da cápsula articular.

Secções ecográficas longitudinais no plano parasagital (Fig.1B e 1C) foram realizadas na face dorsomedial e dorsolateral da articulação MF a fim de avaliar o LC correspondente. Da mesma forma, no aspecto medial e lateral, na altura da base dos ossos sesamoides proximais, foram produzidas imagens transversais (Fig.1D) e longitudinais (Fig.1E) do LS.

Na secção transversal da face palmar (Fig.1F) da articulação MF, o transdutor foi movido lateral e medialmente para obter imagens do LAP. O transdutor foi inclinado para baixo e para cima, a fim de produzir imagens negativas e positivas facilitando a visualização de áreas cicatriciais nos tendões flexores. Macroscopicamente, a espessura do LAP foi medida com auxílio de um paquímetro.

Posteriormente ao exame ultrassonográfico, os espécimes torácicos foram dissecados e submetidos a um estudo macroscópico detalhado das estruturas avaliadas. Critérios como tamanho, forma, consistência, presença de aderências e coloração foram registrados. Os achados macroscópicos foram documentados e fotografados, colhidos e fixados em solução de formol a 10% por um período de 14 dias. Tecidos moles sofreram o processamento de rotina para histologia. Os tecidos ósseos, após a fixação, passaram pela descalcificação em solução aquosa de citrato de sódio e ácido fórmico e foram rotineiramente preparados para histologia. As lâminas foram preparadas (3µm) e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

Nos 30 membros avaliados, 36 estruturas normais foram identificadas pelas técnicas ecográficas e anátomo-histológicas. Estas 36 estruturas incluíram cápsula articular (n= 10), cartilagem articular do McIII (n=2), tendões (n=11) e ligamentos (n=13).

Face dorsal

Na secção ultrassonográfica transversal da face dorsal da articulação MF a superfície articular do osso subcondral do McIII se apresenta como uma superfície óssea lisa hiperecogênica. A imagem da cartilagem articular, que recobre a superfície do osso subcondral do McIII como uma camada de proteção, é representada ultrassonograficamente como uma estrutura anecóica e regular. Neste local também se observa uma estrutura ecogênica que recobre a membrana sinovial e a cápsula articular, que se torna assimétrica no seu aspecto medial e lateral (Fig.2A e Fig.3A). Em condições fisiológicas, é difícil identificar a superfície subcondral do McIII macroscopicamente, pois a mesma está coberta pela cartilagem articular, uma camada brilhante e lisa de coloração branco amarelada (Fig.2B). Na articulação foram observadas pequena quantidade de líquido sinovial. Microscopicamente, o osso subcondral apresenta canais minúsculos (contendo prolongações citoplasmáticas celulares) que atravessam o osso se estendendo de uma superfície óssea a outra onde estão localizados os capilares. Acima do osso subcondral, três camadas cartilaginosas podem ser identificadas; uma profunda que delimita o osso subcondral cujos condrócitos estão dispostos de forma vertical e cujo arranjo de fibras de colágeno é radial. Cobrindo esta, há a camada intermediária em que os condrócitos são maiores e as fibras de colágeno são orientadas de forma aleatória. E por último, a camada superficial apresenta condrócitos achatados ou ovoides e fibras de colágeno dispostas tangencialmente (Fig.2C). Na avaliação macroscópica e histológica, a cápsula articular se apresenta como uma estrutura fibrocartilaginosa de coloração esbranquiçada (Fig.3B), rica em fibras de colágeno e sinoviócitos podem ser observados em sua periferia (Fig.3C). Ela é pouco elástica contribuindo desta forma para manter a estabilidade da articulação. O espessamento da cápsula articular (2 a 3mm) foi um achado comum avaliado por meio da mensuração ultrassonográfica e confirmado macroscopicamente por meio do paquímetro. A membrana sinovial que se localiza na camada interna da cápsula articular é uma estrutura extremamente fina de coloração rosa claro em condições normais e possui uma quantidade abundante de vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Os sinoviócitos se concentram ao longo de toda a extensão do bordo interno da membrana, estando interligados entre as fibras de colágeno.

Face dorsolateral e dorsomedial

Na secção longitudinal, após a localização da fossa colateral lateral ou medial dos côndilos metacarpianos se observa os LCs compostos por duas partes. Uma, superficial ou longa, apresenta fibras longitudinais que percorrem a porção lateral distal do McIII chegando às eminências da primeira falange. A outra, profunda ou curta, situada palmar à parte superficial se aloja na fossa condilar abaxial do McIII com arranjo fibrilar oblíquo. As fibras da parte superficial ou longa são ecogênicas e estão dispostas de forma paralela, sendo facilmente avaliadas. A parte profunda ou curta do ligamento apresenta ecogenidade menor que a superficial, com uma arquitetura organizada em pontos longilíneos (Fig.4A).

Macroscopicamente a parte superficial ou longa apresenta uma espessura que varia de 1 a 2mm apresentando coloração branca amarelada (Fig.4B). Ela é facilmente identificada após a dissecação dos ramos lateral/medial do ligamento suspensório e se liga a parte profunda ou curta do LC na fossa condilar. Histologicamente as fibras de colágeno estão arranjadas em ondas paralelas e são compostas por colágeno (Fig.4C).

Face medial e lateral

Na secção transversal, os ramos distais do LS são facilmente identificados após a localização dos ossos sesamoides proximais na face lateral ou medial. Eles possuem uma forma trapezoide na sua inserção nos bordos apical e abaxial dos ossos sesamoides proximais. A sua aparência é ecogênica e apresenta bordos bem delimitados (Fig.5A). Na secção longitudinal, as fibras possuem orientação linear e paralela. Nesta secção é comum haver falta de contato entre o transdutor e a pele resultando em imagens com falta de paralelismo das fibras. O transdutor deve ser movido no sentido dorso palmar a fim de evitar falsos diagnósticos. Os ramos distais do LS se localizam abaxiais ao recesso palmar da articulação MF e contêm vasos circundados por tecido conectivo. Eles apresentam coloração branca amarelada (Fig.5B), aspecto denso e arranjo linear das fibras similar aos tendões. A entrada vascular ocorre entre as fâscias que circundam seus fascículos (Fig.5C) e com células acompanhando a orientação das fibras colágenas chamadas de desmócitos.

Face palmar

Na abordagem transversal da face palmar da articulação MF, abaixo da pele se visualiza tecido conectivo regular denso e em seguida o LAP. O LAP é visualizado como uma faixa hipocogênica que cobre o TFDS e se liga ao mesmo por uma estrutura hiperecogênica chamada mesotendão. O LAP se insere nos bordos dos sesamoides proximais e se estende lateral e medialmente aos bordos do LI. Ossos sesamoides

proximais, LAP e LI formam um canal inelástico por onde passam os tendões flexores chamado de canal do boleto. O LAP é difícil de ser identificado na imagem ultrassonográfica porque a sua espessura na maioria dos casos é inferior a 1mm. Devido à hipoeogenicidade da bainha sinovial se obtém melhor definição do LAP e do TFDS afastando o transdutor medial ou lateralmente em relação ao eixo do membro. A coloração do LAP variou de branco perolado, branco amarelado a amarelo cinzento. Não houve relação entre variações na coloração e alterações ultrassonográficas ou histológicas. No exame histológico, as fibras colágenas do LAP apresentaram orientação em ondas paralelas. Havia quantidade variável de tecido conectivo regular denso entre o LAP e a pele. Macroscopicamente o espessamento do LAP em condições patológicas está acompanhado a áreas de aderência entre a bainha sinovial e o TFDS.

O TFDS na face palmar da articulação MF adota um formato plano e conforme a movimentação lateral ou medial do transdutor ele se torna mais amplo (Fig.6A). Ele recobre o TFDP e o envolve por meio de uma estrutura fibrocartilaginosa chamada de manica flexora que permite o deslizamento destas estruturas durante a fase de hiperextensão da articulação MF, sem que ocorra aderência entre os tendões flexores. A arquitetura do TFDS se caracteriza por ecos longilíneos na secção ultrassonográfica transversal do tendão. Já o TFDP produz ecos pontuais com ecogenicidade maior, formato oval e bordos bem delimitados e lisos. Macroscopicamente a face palmar do TFDP que está em contato com o TFDS é lisa. Anatomicamente os bordos lateral e medial do TFDS emitem uma continuação com formato semelhante a uma faixa formando um anel que envolve o TFDP (Fig.6B). O conjunto das fibras tendíneas forma fascículos facilmente identificados no corte transversal do tendão e, organizadas de forma paralela sendo envolvidas por tecido conectivo. A cor varia de branco perolado a amarelo claro. Microscopicamente os tenócitos na secção transversal estão agrupados linearmente ao longo das fibras tendíneas (Fig.6C). Tecido conectivo regular denso envolve as fibras e desta forma ocorre o agrupamento em fascículos. Já na secção longitudinal o arranjo das fibras é linear.

O LI ou ligamento palmar é identificado como uma estrutura fina, ecogênica que ocupa o espaço de 3 a 6mm formado pelos ossos sesamoides proximais. Macroscopicamente é uma estrutura fibrocartilaginosa que cobre os ossos sesamoides proximais sendo mais espessa no centro e se tornando progressivamente mais fina em direção aos bordos. Microscopicamente apresenta disposição fibrilar muito semelhante à parte superficial ou longa do LC lateral/medial.

DISCUSSÃO

A avaliação anatômica macroscópica e histológica foram os métodos utilizados como referência para avaliar a sensibilidade da técnica ultrassonográfica na articulação MF. Estas avaliações permitiram a caracterização da cartilagem articular, cápsula articular, tendões flexores, LAP, LCs, LS e LI sadios. Estas são as estruturas mais frequentemente afetadas por alterações traumáticas e degenerativas adquiridas em decorrência da modalidade esportiva, tipo de criação e manejo dos animais. As associações destas diferentes técnicas de avaliação contribuem com informações que tornam a interpretação do exame ultrassonográfico e, portanto o diagnóstico clínico, mais preciso.

A cartilagem articular aparece como uma linha regular hipoeogênica localizada entre a membrana ou fluído sinovial e o osso subcondral hipereogênico medindo 0,5 a 1mm (Denoix 2009). Vanderperren et al. (2012) observaram que alterações ultrassonográficas do aspecto dorsal do boleto são caracterizadas por formações de osteófitos e por anormalidades de superfície óssea subcondral que variavam de pequenas indentações a severas irregularidades. Foi observado em nosso estudo, que a espessura da cartilagem articular deve ser avaliada ultrassonograficamente em toda a sua extensão, pois a sua diminuição pode indicar fibrilação ou erosão cartilaginosa. Histologicamente é possível diferenciar facilmente as três camadas da cartilagem articular contendo condrócitos de diferentes formas em cavalos adultos (McIlwraith 2001). De Bastiani et al. (2014) observaram que quando ocorre perda cartilaginosa, ela inicia na camada superficial se estendendo posteriormente até a camada profunda com possível exposição do osso subcondral. Baseado na avaliação anatômica macroscópica do nosso estudo, a cartilagem articular deve apresentar a superfície brilhante e recobrir toda a extensão do osso subcondral do côndilo do McIII sem apresentar fissuras. Sendo esta uma característica importante, pois permite estimar a integridade da cartilagem articular. A presença de irregularidades ósseas, fissuras cartilaginosas e formação de osteófitos é compatível com alteração patológica da mesma. A fibrilação cartilaginosa representa a perda progressiva das camadas da cartilagem chegando, em muitos casos, à eburnação da mesma e a consequente exposição do osso subcondral (De Bastiani et al. 2014). O osso subcondral quando lesionado por processos traumáticos ou inflamatórios, acarreta lesão secundária da cartilagem articular devido à falta de suporte ósseo com liberação de citocinas inflamatórias (Lajeunesse & Reboul 2003, McIlwraith 2005). Uma vez degradada, a cartilagem articular não possui a capacidade de autorregeneração e nos casos onde houver perda de cartilagem com exposição do osso subcondral, ocorrerá a formação de tecido cicatricial fibroso (Hurtig et al. 1998). No presente estudo somente foram

selecionadas cartilagens articulares que não apresentassem as alterações descritas acima. O número reduzido de estruturas selecionadas se deve ao fato de que os espécimes foram obtidos em matadouro para onde são destinados cavalos de descarte e a degeneração cartilaginosa é encontrada com frequência na articulação MF equina.

Nas secções ultrassonográficas longitudinais e transversais da face dorsal da articulação MF, a cápsula articular se localiza entre os tendões extensor dorsal e lateral (hipoecogênicos), a cartilagem articular anecóica e o McIII hiperecogênico subjacente (Denoix et al. 1997). O espessamento da cápsula articular (acima de 2 a 3mm) foi um achado ultrassonográfico comum e confirmado macroscopicamente utilizando-se do paquímetro. Este espessamento, quando bilateral e não acompanhado de outras alterações, parece ser uma variação anatômica normal. Uma estrutura importante a ser avaliada é a camada dorsal da cápsula articular, que se encontra em íntimo contato com a membrana sinovial, pois o avermelhamento e espessamento desta estrutura é considerado uma indicação de patologia. A camada interna da cápsula articular deve ser lisa e brilhante, podendo apresentar vilosidades. Geralmente a cápsula articular possui uma forma assimétrica no seu aspecto lateral e medial e está localizada dorsolateral e dorsomedial à crista sagital do côndilo metacarpiano (Denoix 1996).

Os LC são facilmente identificados quando se inicia o exame, localizando-os no plano sagital para em seguida avaliá-los no plano transversal. Ambas as parte superficial (longa) e profunda (curta) do LC apresentam fibras paralelas e espessura semelhante entre os aspectos medial e lateral da articulação na secção transversal (Reef 1998). Segundo Vanderperren et al. (2008), a parte superficial ou longa se origina na face distal do McIII e segue distalmente se inserindo na face proximal lateral/medial da primeira falange. A parte profunda ou curta é triangular e se origina na fossa condilar abaxial correndo oblíqua na direção palmar distal e se inserindo na primeira falange e ossos sesamoides. Desvios na conformação axial do membro podem predispor a uma sobrecarga articular e à maior tensão sobre o LC resultando no seu espessamento (Yovich et al. 1987). Alterações na ecogenicidade acompanhadas de espessamento e da presença de osteófitos articulares são achados anormais do LC. Porém, como visto neste estudo, o espessamento por si só não significa uma alteração patológica deste ligamento.

Na região distal do McIII, o LS se divide em dois ramos distintos adotando a forma de halteres na imagem transversal. Devido à refração resultante da sombra criada pelos bordos dos tendões flexores, não se identifica os ramos distais do LS de forma adequada a partir do aspecto palmar do membro (Smith 2008). Nas imagens longitudinais as fibras aparecem dispostas em arranjo linear e em íntimo contato com o osso sesamoide proximal correspondente. Irregularidades da superfície óssea dos sesamoides proximais juntamente com modificações na ecogenicidade e tamanho podem ser indicativos de patologia dos mesmos.

O LAP é espesso na secção transversal, tornando-se mais fino na sua inserção lateral e medial na superfície flexora dos ossos sesamoides proximais. As superfícies flexoras aparecem neste local como duas linhas curtas, ligeiramente convexas e hiperecogênicas, produzindo sombras acústicas na parte dorsal (Seignour et al. 2012). No exame macroscópico, a inserção do LAP está fortemente aderida aos ossos sesamoides proximais e seu afinamento é visível. A espessura aumentada do LAP associada à presença de áreas de aderência ao TFDS resulta em alterações histopatológicas do LAP e do TFDS (De Bastiani et al. 2014). O transdutor deve ser movido lateral e medialmente para obter imagens da inserção do LAP nos sesamoides proximais. Segundo Smith (2008), isto facilita a diferenciação entre o LAP e o tendão devido à hipoecogenicidade da bainha sinovial. Ultrassonograficamente o espessamento do tecido conectivo regular denso não deve ser confundido com patologias de LAP.

Na face proximal dos ossos sesamoides proximais, o TFDS envolve o TFDP, formando um anel chamado de manica flexora. O aspecto distal da manica flexora está localizado abaixo do LAP (Wilderjans 2008). Na relação entre estas estruturas a presença de aderências é indicativa de alteração. O bordo palmar do TFDP deve ser bem delimitado e liso sem apresentar fissuras verticais. Na região metacarpo/metatarsiana, o TFDP adquire forma oval e se torna mais largo e triangular distalmente no aspecto palmar/plantar da articulação MF. Juntamente com a manica flexora, o TFDP desliza pelo scutum proximal, composto pelo LAP e os dois ossos sesamoides proximais (Denoix 2000). Por isto, é de extrema importância que a avaliação das estruturas que compõem a face palmar da articulação MF seja realizada em conjunto. Em condições biomecânicas normais, a articulação MF pode ser flexionada e estendida durante o exame ecográfico permitindo observar o movimento simultâneo destas estruturas e a eventual presença de aderências. Avaliando-se a coloração dos tendões e ligamentos no estudo macroscópico, ela variou de branco perolado a amarelo claro e vermelho acinzentado. Segundo Gartner & Hiatt (1997), o amadurecimento dos tendões pode ser responsável por mudanças na sua cor bem como o aparecimento de zonas centrais marrom escuras ou vermelho acinzentadas. Como não foi possível obter informações sobre a idade dos animais, não se estabeleceu esta relação no estudo.

CONCLUSÕES

Os achados macroscópicos e histológicos da articulação MF normal neste objeto de estudo descrevem parâmetros como a arquitetura, tamanho, forma e coloração de tendões, ligamentos, cápsula e cartilagens articulares. Características estas, que servem como base para uma interpretação ultrassonográfica correta contribuindo desta forma, para um diagnóstico por imagem de excelência. O espessamento da cápsula articular e do LAP podem ser considerados como uma variação anatômica de cada animal.

Agradecimentos.- Os autores agradecem ao Frigorífico Foresta pela contribuição neste estudo por meio do fornecimento dos espécimes de membros torácicos equinos.

REFERÊNCIAS

- Barone R. 1989. Articulations metacarpal-phalangienna, p.187-204. In: Anatomies des Mammifères Domestiques – Tome 2: Arthrologie et Myologie. Vigot, Paris.
- De Bastiani G., De La Côte F.D., Brass K.E., Kommers G.D. & Denoix J.M. 2014. Association of ultrasound and anatomopathologic findings of equine metacarpophalangeal lesions. *J. Equine Vet. Sci.* 34:1218-1225.
- Denoix J.M. 1996. Ultrasonography examination in the diagnosis of joint disease, p.165-202. In: McIlwraith C.W. & Trotter G.W. (Eds), *Joint disease in the horse*. Saunders, Philadelphia.
- Denoix J.M., Busoni V. & Olalla M.-J. 1997. Ultrasonographic examination of the proximal scutum in the horse. *Equine Vet. J.* 29:136-141.
- Denoix J.M. 2000. The equine distal limb, p.243-376. In: *Atlas of clinical anatomy and comparative imaging*, Manson Publishing, London.
- Denoix J.M. 2009. Ultrasonographic examination of joints in horses: a live demonstration. Proceedings of the 11th international congress of the World Equine Veterinary Association, Guarujá, SP, Brazil, p.1-10.
- Gartner L. P. & Hiatt J.L. 1997. *Color Textbook of Histology*. Saunders, Philadelphia, p.92-108.
- Hurtig M.B., Fretz P.B., Doige C.E. & Schnurr D.L. 1998. Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair mark. *Can. J. Vet. Res.* 59:137-146.
- Lajeunesse D. & Reboul P. 2003. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Rheumatology* 15:628-633.
- McIlwraith C.W. 2005. From arthroscopy to gene therapy: 30 years of looking in joints. *Am. Assoc. Equine Pract.* 51:65-113.
- McIlwraith C.W. 2001. Disease processes of synovial membrane, fibrous capsule, ligaments, and articular cartilage. Proceedings of the 47th annual convention of the American Association of Equine Practitioners. San Diego, CA, USA, p.142-156.
- Reef V.B. 1998. Musculoskeletal ultrasonography, p.39-79. In: *Equine Diagnostic Ultrasound*. Saunders, Philadelphia.
- Seignour M., Coudry V., Norris R. & Denoix J.M. 2012. Ultrasonographic examination of the palmar/plantar aspect of the fetlock in the horse: Technique and normal images. *Equine Vet. Educ.* 24:19-29.
- Smith R. 2008. Tendon and ligament injury. Proceedings of the 54th annual convention american association of equine practitioners, San Diego, USA, p.475-501.
- Wilderjans H. 2008. Tenoscopy of the digital flexor tendon sheath. Proceedings of the 10th international congress of the World Equine Veterinary Association, Moscow, Russia, p.182-187.
- Yovich J.V., Turner A.S., Stashak T.S. & McIlwraith C.W. 1987. Luxation of the metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints in horses. *Equine Vet. J.* 19:295-298.
- Vanderperren K., Ghaye B., Snaps F.R. & Saunders J.H. 2008. Evaluation of computed tomographic anatomy of the equine metacarpophalangeal joint. *Am. J. Vet. Res.* 69:631-638.
- Vanderperren K., Gielen I., Caelenberg A.V., Van der Vekens E., Raes E.V., Hauspie S., Van Bree H. & Saunders J.H. 2012. Ultrasonographic appearance of bony abnormalities at the dorsal aspect of the fetlock joint in geriatric cadaver horses. *The Vet. J.* 193:129-134.

Figuras e legendas

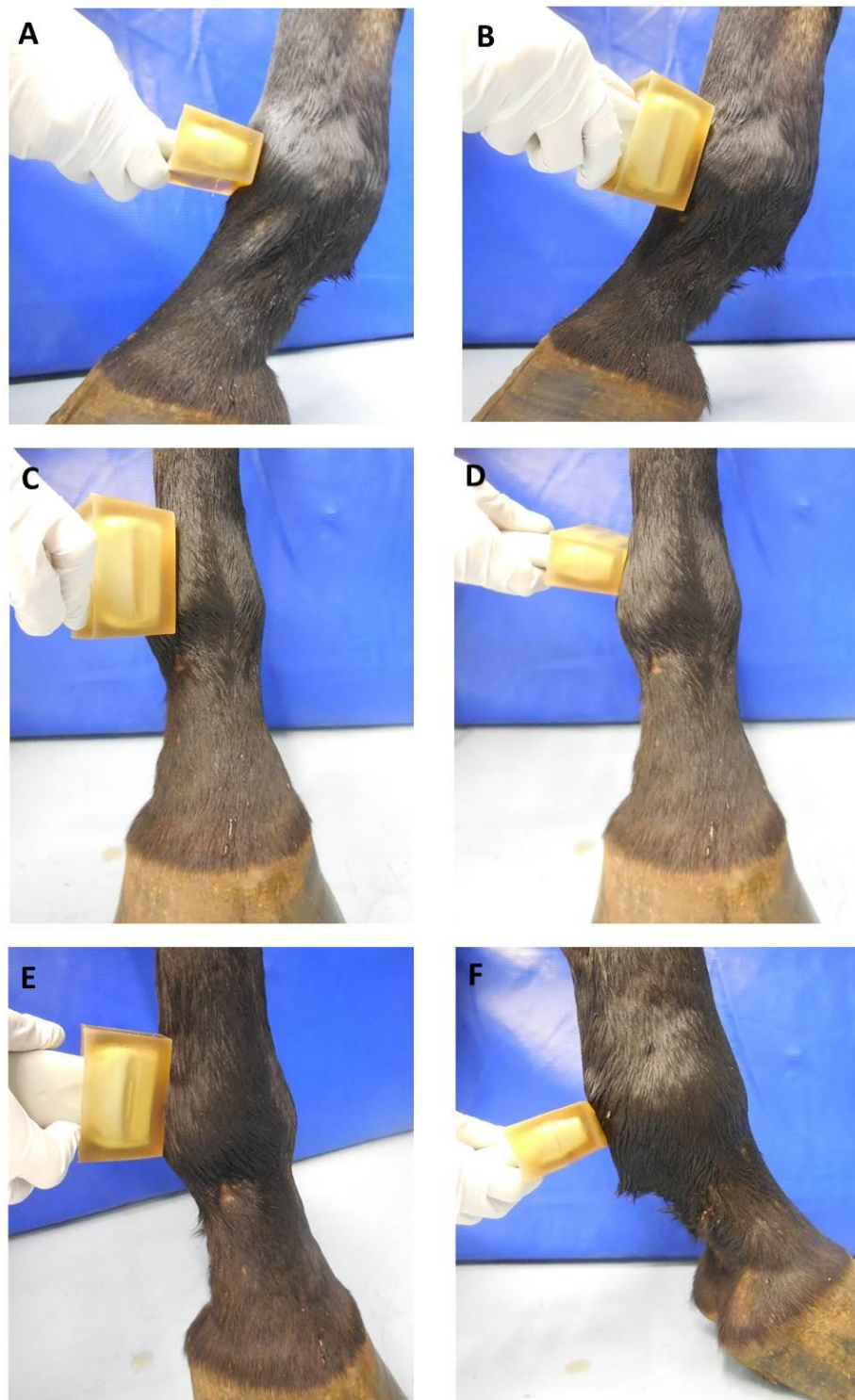


Fig.1. (A) Secção ultrassonográfica transversal da face dorsal da articulação MF. (B) Secção longitudinal parasagital do ligamento colateral lateral da articulação MF [transdutor situado na fossa condilar abaxial do McIII para a visualização da parte curta ou profunda do ligamento colateral da articulação MF]. (C) Secção longitudinal parasagital do ligamento colateral lateral [parte superficial ou longa] da articulação MF [face dorsolateral da articulação MF]. (D) Secção ultrassonográfica transversal do ligamento suspensório [face medial da articulação MF e abaxial do osso sesamoide proximal medial]. (E) Secção ultrassonográfica longitudinal parasagital do ligamento suspensório [face medial da articulação MF]. (F) Secção ultrassonográfica transversal da face palmar da articulação MF.

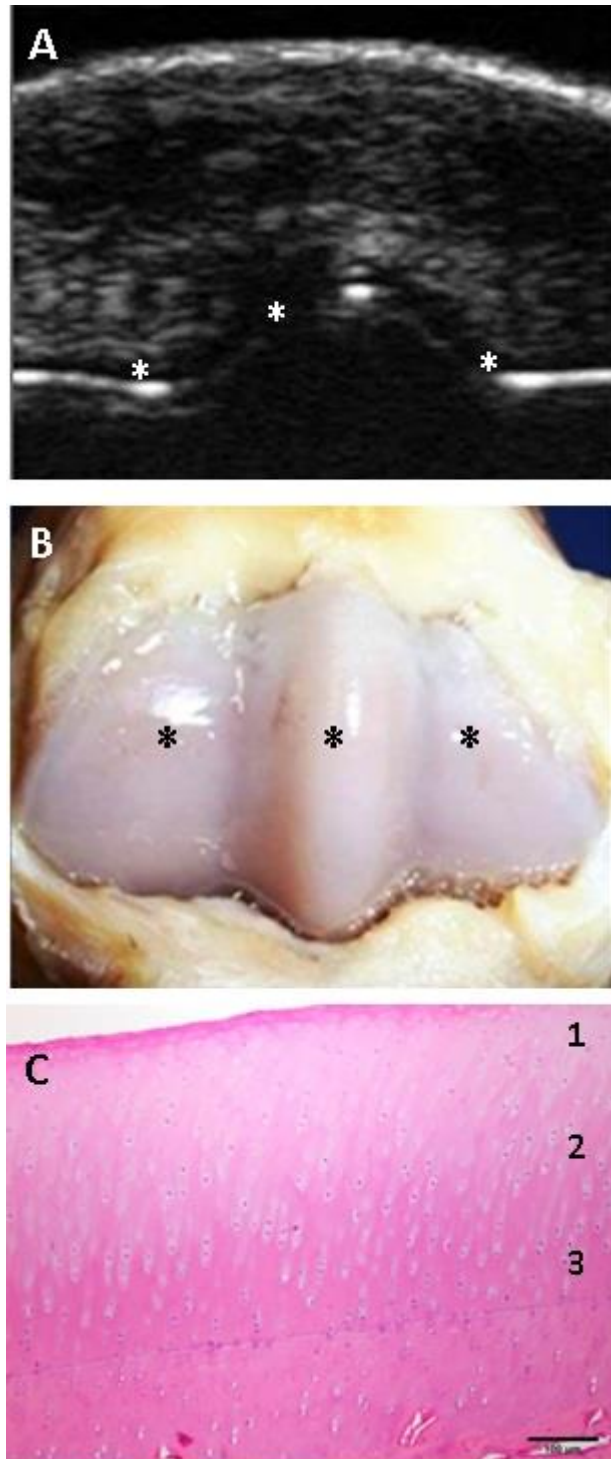


Fig.2. (A) Secção ultrassonográfica transversal da face dorsal da articulação MF. Medial para esquerda e lateral para a direita. A cartilagem articular é representada pela linha regular anecóica recobrimdo a superfície óssea do MCIJ [asterisco]. (B) Imagem macroscópica da cartilagem articular esbranquiçada brilhante cobrindo o côndilo do MCIJ e crista sagital [asterisco]. (C) Secção transversal histológica ilustrando as três camadas da cartilagem articular: [1] Camada superficial; [2] Camada intermediária; [3] Camada profunda.

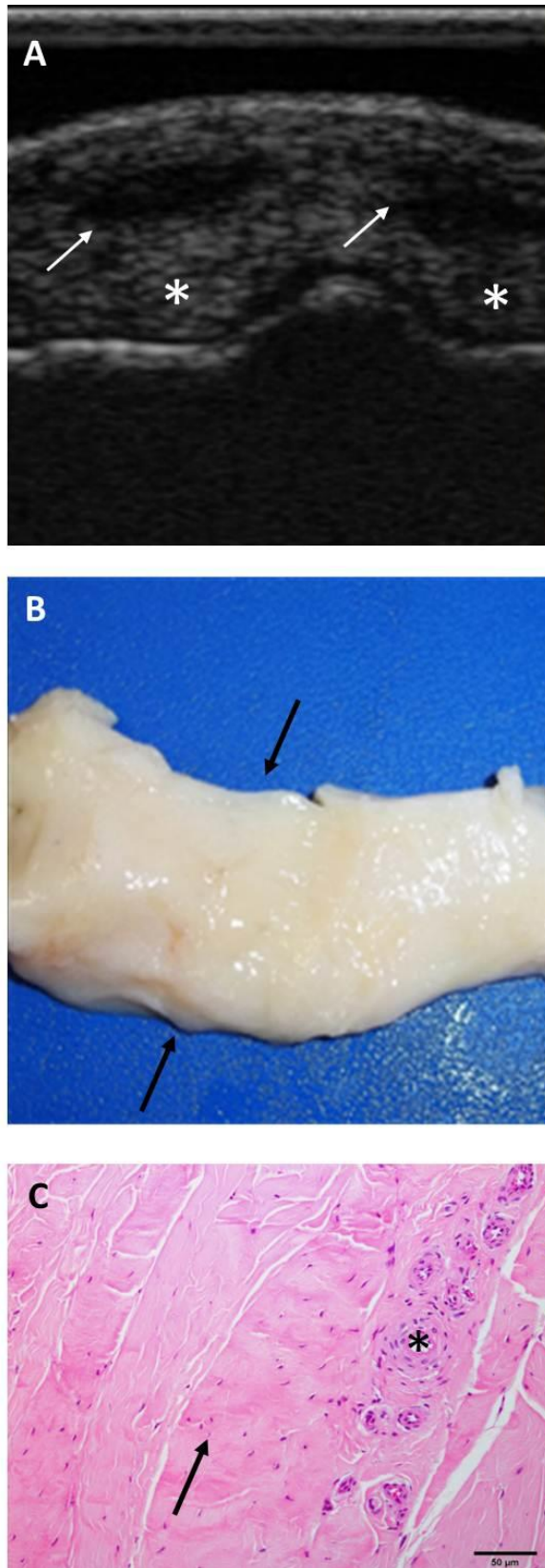


Fig.3. (A) Secção ultrassonográfica transversal da face dorsal da articulação MF. Medial para a esquerda e lateral para a direita. Cápsula articular ecogênica [asterisco] recobrendo a cartilagem articular do côndilo do McIII no aspecto medial e lateral e localizada abaixo dos tendões extensor dorsal e extensor lateral do dedo [seta]. (B) Superfície externa da cápsula articular. (C) Secção longitudinal histológica da cápsula articular. Fibras de colágeno [seta] e vasos sanguíneos [asterisco].

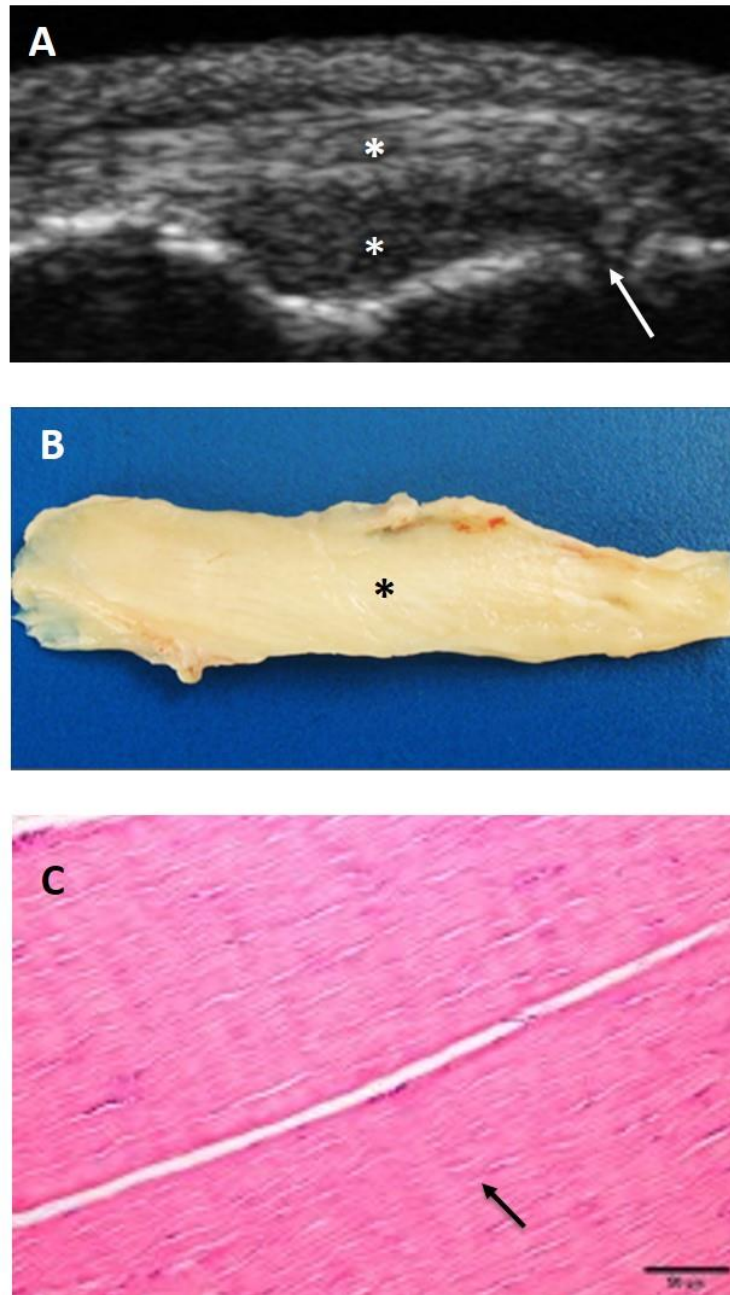


Fig.4. (A) Secção ultrassonográfica longitudinal da face lateral da articulação MF Proximal para a esquerda e distal para a direita. Parte superficial do LC ecogênica [asterisco]. Parte profunda do LC hipocogênica ocupando a fossa condilar [asterisco]. Espaço articular [seta]. (B) Parte superficial do LC dissecada [asterisco]. (C) Secção longitudinal histológica da parte superficial do LC. Note o arranjo ondulado das fibras de colágeno [seta].

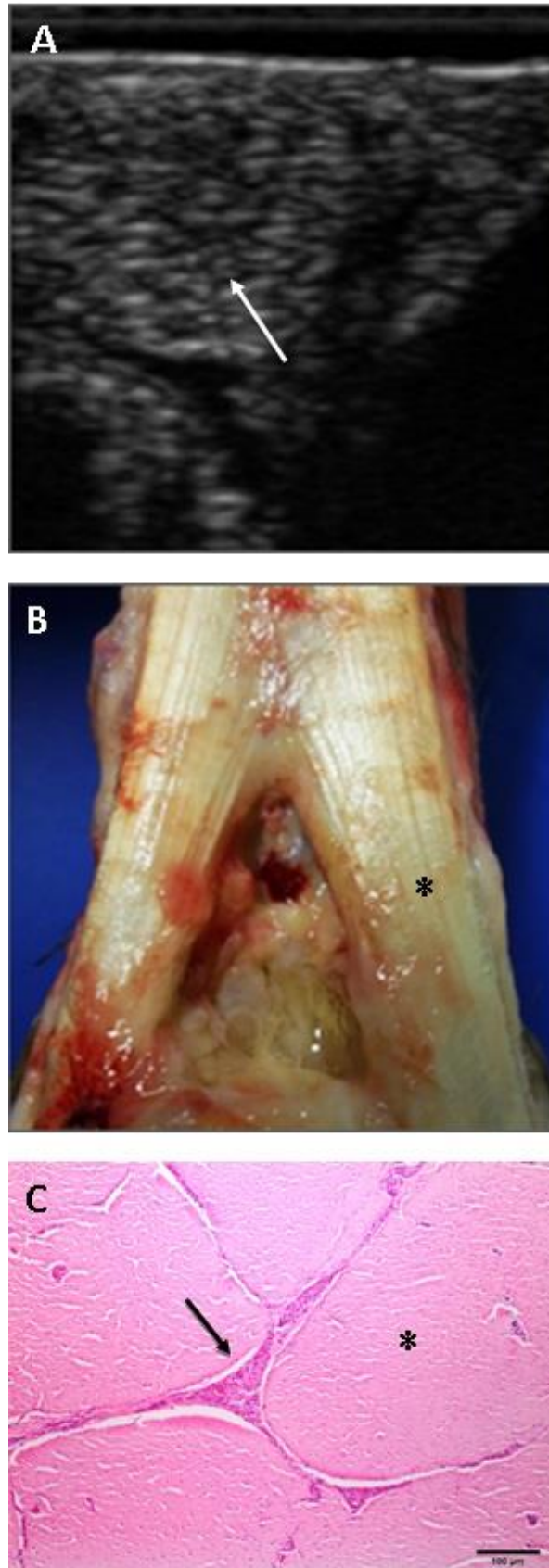


Fig.5. (A) Secção ultrassonográfica transversal do ramo medial do LS [seta]. Medial para a esquerda e lateral para a direita. (B) Ramo medial do LS [asterisco]. (C) Secção histológica transversal mostrando o arranjo em fascículos do LS circundado por tecido conjuntivo regular denso [seta] e o arranjo das fibras colágenas [asterisco].

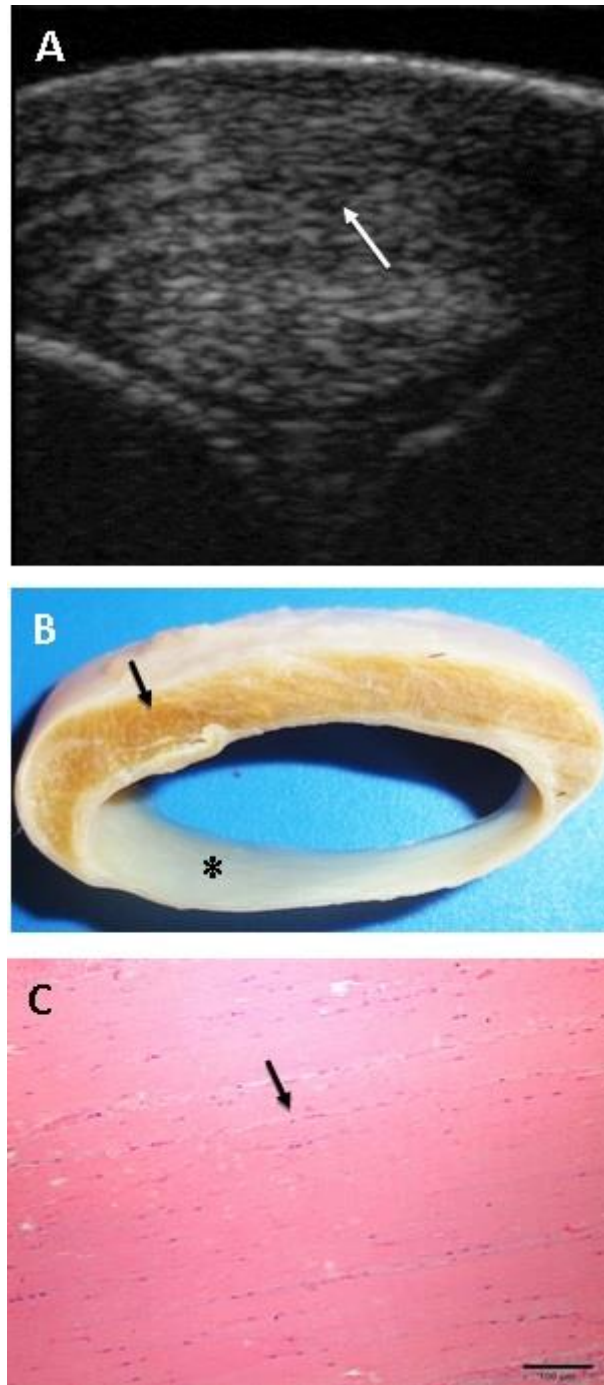


Fig.6. (A) Secção ultrassonográfica transversal da face palmar da articulação MF. Medial para a esquerda e lateral para a direita. O ecogênico TFDS [seta]. (B) Camada peritendinosa do TFDS [seta] e manica flexora [asterisco]. (C) Secção histológica longitudinal do TFDS. Tenócitos intercalados por fibras colágenas [seta].

4. ARTIGO 2

Trabalho a ser submetido para publicação:

Relação entre degeneração cartilaginosa articular do côndilo do metacarpiano III e entesopatias dos ligamentos colaterais da articulação metacarpofalangeana

Grasiela De Bastiani, Flavio De La Côte, Karin Erica Brass, Camila Cantarelli, Stéfano Leite Dau, Marcos da Silva Azevedo, Taiara Muller da Silva e Glauca Denise Kommers

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, 2017

Relação entre degeneração cartilaginosa articular do côndilo do metacarpiano III e entesopatias dos ligamentos colaterais da articulação metacarpofalangeana¹

Grasiela De Bastiani^{2*}, Flávio D. De La Côte², Karin E. Brass², Camila Cantarelli², Stéfano L. Dau², Marcos S. Azevedo³, Taiara M. da Silva⁴, Gláucia D. Kommers⁴

ABSTRACT.- De Bastiani G., De La Corte F.D., Brass K.E., Cantarelli C., Dau S.L., Azevedo M.S., Silva T.M. & Kommers G.D. 2017. [**Relationship between cartilaginous joint degeneration of the condyle of the metacarpal III and enthesopathies of the collateral ligaments of the metacarpophalangeal joint.**] Relação entre degeneração cartilaginosa articular do côndilo do metacarpiano III e entesopatias dos ligamentos colaterais da articulação metacarpofalangeana. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: grasibage@hotmail.com.

Joint degenerations in the dorsal aspect of the metacarpophalangeal joint (MF) are characterized by irregularities in the bone surface of the metacarpal III condyle (MCIII) associated to decreasing joint space. Osteophytes, enthesophytes and joint biomechanics may predispose to the development of alterations to the collateral ligaments (LC) of the MF joint. The aim of the present study was to determine the relationship between degenerative processes of the articular cartilage and the enthesopathies of LC (superficial or deep portion) of the equine MF joint, using radiographic, ultrasonographic and anatomopathological techniques, as well as establishing their sensitivity. Thirty equine forelimbs were selected from animals that died due to different causes with an average age of 5.7 years and came from a private clinic or assigned to the Laboratory of Veterinary Pathology of UFSM. The specimens were placed in a hydraulic press and submitted to radiographic evaluation (lateromedial, flexed lateromedial, dorsopalmar, dorsolateral-palmaromedial oblique 45° and dorsomedial-palmarolateral oblique 45° projections) of the MF joint. Ultrasound evaluation of the dorsal and collateral aspect of the MF joint was carried out using a *Sonosite Edge* machine with a 5-10 MHz linear transducer using transverse and longitudinal images. The specimens were forwarded for macroscopic evaluation and routinely processed for histology. A highly positive correlation r^2 ($p < 0.001$) was observed between ultrasonographic and macroscopic techniques, evidencing a relationship between the cartilaginous degenerations of the MF joint and the medial and lateral LC enthesopathies.

INDEX TERMS: articular cartilage; collateral ligaments; metacarpophalangeal joint; equine.

RESUMO.- Degenerações articulares no aspecto dorsal da articulação metacarpofalangeana (MF) são caracterizadas por irregularidades na superfície óssea do côndilo metacarpiano III (MCIII) associadas à diminuição do espaço articular. Osteófitos, entesófitos e a biomecânica articular podem predispor ao desenvolvimento de alterações aos ligamentos colaterais (LC) da articulação MF. O objetivo do presente estudo é determinar a relação entre os processos degenerativos da cartilagem articular e entesopatias dos LC (porção superficial ou profunda) da articulação MF equina, por meio das técnicas radiográficas, ultrassonográficas, anatomopatológicas e bem como, estabelecer a sensibilidade das mesmas. Trinta membros torácicos equinos com idade média de 5,7 anos que, morreram por diferentes causas, oriundos

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Clínica de Grandes Animais, Hospital Veterinário Universitário (HVU), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Campus Universitário, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: grasibage@hotmail.com

³ Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguai, Estrada BR472 KM 585, Uruguai, RS 97501-970, Brasil.

⁴ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFSM, Av. Roraima 1000, Campus Universitário, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

de uma clínica privada ou destinados ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM, foram selecionados. Os espécimes foram colocados numa prensa hidráulica e submetidos à avaliação radiográfica (projeções lateromedial, lateromedial flexionada, dorsopalmar, dorsolateral-palmaromedial oblíqua 45° e dorsomedial-palmarolateral oblíqua 45°) da articulação MF. Posteriormente, foi realizada avaliação ultrassonográfica do aspecto dorsal e colateral da articulação MF com um aparelho *Sonosite Edge*, transdutor linear de 5-10 MHz, por meio de imagens transversais e longitudinais. Os espécimes foram encaminhados para a avaliação macroscópica e rotineiramente processados para histologia. Uma correlação positiva ($r^2=0,69$; $p<0,001$) foi observada entre as técnicas ultrassonográficas e macroscópicas, evidenciando uma relação entre as degenerações cartilaginosas da articulação MF e entesopatias dos LC medial e lateral.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: cartilagem articular; ligamentos colaterais; articulação metacarpofalangeana; equinos.

INTRODUÇÃO

A região apical palmar/plantar do côndilo do III osso metacarpiano /metatarsiano é um local de predileção para ocorrência de artrose na articulação MF de cavalos de corrida (Radtke et al. 2003). Estas artroses acontecem em decorrência da sobrecarga mecânica, sendo caracterizadas por danos à cartilagem articular, esclerose e subsequente necrose óssea subcondral, que podem ocorrer simultaneamente (Santischi 2008). Traumas sobrecarregam as articulações causando remodelação articular aumentando desta forma a sua resistência, mas em consequência ocorrem a fibrilação e colapso da cartilagem articular (Radin et al. 1991). Este processo é frequentemente descrito em cavalos de corrida e é provavelmente desencadeado pela falha prematura da cartilagem articular hialina (Murray et al. 2001). Os LC são estruturas responsáveis por limitar o movimento da articulação MF no plano sagital e na suspensão do boleto e são compostos por duas porções sendo uma, a camada superficial ou longa e a outra constitui a porção profunda ou curta que é oblíqua e triangular (Barone 1989). Desvios angulares dos membros torácicos predispõem a sobrecarga e ação de forças compressivas na articulação aumentando a tensão sobre os LC resultando, possivelmente, no seu espessamento (Yovich et al. 1987).

O objetivo do presente estudo é determinar a relação entre alterações da cartilagem articular do côndilo do MCIII e a presença de entesopatias dos LC da articulação MF, por meio de avaliações radiográficas, ultrassonográficas e anatomopatológicas, assim como demonstrar a aplicabilidade das técnicas quanto a avaliação do aspecto dorsal da articulação MF.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta espécimes do membro torácico (MT) de cavalos da Raça Crioulo ($n=30$), com idade média de 5,7 anos, provenientes de animais atendidos na Clínica Hípica de Porto Alegre e do Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM que foram a óbito ou submetidos à eutanásia por diversas condições foram utilizados nesse trabalho. Os espécimes foram seccionados ao nível da articulação intercarpiana e congelados em freezer a 4°C. Depois de congeladas na origem, os espécimes foram enviados à Universidade Federal de Santa Maria e acondicionados a 4°C até o momento do processamento e posteriormente descongelados.

Para obtenção das imagens radiográficas e ultrassonográficas os espécimes foram colocados em uma prensa hidráulica e submetidos a uma força de 400-500 kg, de forma a mimetizar o apoio e biomecânica mais próxima do normal de um cavalo em estação (Fig.1).

A avaliação radiográfica foi realizada segundo Vanderperren e Saunders (2009) usando as seguintes projeções: lateromedial (LM) e LM flexionada (LMF); dorsopalmar (DP); dorsolateral-palmaromedial oblíqua 45° (DLPMO) e dorsomedial-palmarolateral oblíqua 45° (DMPLO). A avaliação das imagens radiográficas foi realizada por uma avaliação cega baseando-se nos parâmetros descritos por Park et al. (1996) e classificadas em: 0 - sem alterações; I - alterações leves; II - alterações moderadas, III - alterações severas; IV - alterações muito severas, para a presença de osteófitos periarticulares, diminuição do espaço articular, esclerose óssea subcondral, osteólise do osso subcondral e presença de cisto ósseo subcondral.

Posteriormente os espécimes foram tricotomizados na região dorsal, medial e lateral da articulação MF para a obtenção das imagens ultrassonográficas (US), as quais foram realizadas com um aparelho de ultrassom *Sonosite* equipado com um transdutor linear de 7,5-10 MHz por meio de um avaliador experiente, que não obteve conhecimento prévio dos resultados da avaliação radiográfica. Para ampliar a superfície de contato entre o transdutor e a estrutura a ser avaliada foi usado um *stand off pad*.

Os espécimes foram submersos em água morna para facilitar a passagem das ondas ultrassonográficas e posteriormente foi usado gel para melhorar a coaptação do transdutor à pele. A área avaliada se estendeu desde o aspecto proximal da inserção da cápsula articular até seu aspecto distal, abrangendo toda a superfície articular dorsal. No aspecto abaxial foi avaliada a inserção proximal e distal dos LC. Os pontos anatômicos considerados foram à superfície óssea do côndilo do MCIII e a cartilagem articular. Secções ultrassonográficas longitudinais foram obtidas no plano sagital e parasagital, no aspecto dorsal e abaxial da articulação, avaliando a ecogenicidade, arquitetura, tamanho e forma das fibras do LC longo (ou superficial) e LC curto (ou profundo). O espaço articular e a presença de osteófitos ou entesófitos articulares foram avaliados. Secções ultrassonográficas transversais da articulação foram realizadas posicionando o transdutor perpendicular à superfície articular e acompanhando até o limite abaxial (medial/lateral), obtendo imagens da superfície óssea do côndilo do MCIII e possíveis irregularidades. A integridade da cartilagem articular também foi avaliada durante essa abordagem, sendo que a mesma se apresenta como um espaço anecóico e regular que pode estar espessado devido à efusão sinovial ou diminuído devido a diminuição da espessura da cartilagem, associada a irregularidades na superfície óssea do MCIII (De Bastiani et al. 2014). O membro contralateral foi avaliado como controle das imagens ultrassonográficas consideradas com alteração.

Os espécimes que apresentaram evidências de alterações nas imagens radiográficas e/ou ultrassonográficas foram identificados e preparados para avaliação anatomopatológica. Inicialmente as estruturas oriundas da parte superficial e profunda dos LC medial e lateral, cartilagem articular do côndilo do MCIII foram avaliadas macroscopicamente e as lesões catalogadas.

Posteriormente, as amostras foram fotografadas e fixadas em solução de formol tamponado a 10% durante um período de 14 dias. As amostras de tecidos moles foram processadas rotineiramente para histopatologia. As amostras de osso subcondral e cartilagem articular do MCIII de casos selecionados, após a sua fixação, passaram por um processo de descalcificação em solução aquosa de citrato de sódio-ácido fórmico para posterior processamento histológico e preparação de secções de 3µm coradas pela técnica hematoxilina-eosina (H-E). Espécimes selecionados foram corados pela técnica azul alciano.

Assim como para a avaliação radiográfica, as alterações encontradas durante as avaliações ultrassonográficas e macroscópicas foram classificadas em 0, sem alterações; I, alterações leves; II, alterações moderadas; III, alterações severas e IV, alterações muito severas (Quadro 1). A análise estatística foi primeiramente realizada com o intuito de linearizar os dados, sendo assim as variáveis de alterações radiográficas, ultrassonográficas e macroscópicas das lesões degenerativas cartilaginosa e de entesopatias dos ligamentos colaterais da articulação MF foram transformadas em variáveis numéricas e posteriormente em logaritmo neperiano ($\text{Log}_{\text{variável}}$). Em seguida foram testadas quanto à normalidade residual pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene. Após, as variáveis estudadas foram submetidas à análise de correlação de Pearson com o procedimento correlação (PROC CORR) e comando Pearson. As análises estatísticas foram executadas no aplicativo SAS® System for Windows™ versão 9.0.

RESULTADOS

Conforme descrito anteriormente as amostras avaliadas no aspecto macroscópico e histopatológico foram selecionadas pela presença de alterações identificadas nos exames radiográficos e ultrassonográficos, sendo divididas em: alterações nos côndilos MCIII (48,39%, X/n total n=30); nos ligamentos colaterais laterais (29,03%, X/n total n=18); nos ligamentos colaterais mediais (22,58%, X/n total n=14) em um total de n=30 MT selecionados,

Avaliação radiográfica

Doze espécimes (40%) não apresentaram alterações radiográficas; 16 (53,33%) espécimes apresentaram leve osteólise de osso subcondral associada à leve diminuição de espaço articular e osteófitos periarticulares (grau I); um espécime (3,33%) apresentou moderada osteólise de osso subcondral associada à moderada diminuição de espaço articular e a presença de osteófitos periarticulares (grau II) e em um (3,33%) espécime se observou severa diminuição de espaço articular associada à subluxação, osteólise de osso subcondral e osteófitos periarticulares (grau IV).

Avaliação ultrassonográfica

Quatorze espécimes (46,66%) examinados apresentaram alterações de grau I, representadas por diminuição do espaço marginal articular como previamente descrito na avaliação radiográfica e observado de forma mais evidente na ultrassonografia devido à possibilidade de comparação com o

membro contralateral. Não foram observadas alterações ultrassonográficas dos LC lateral ou medial, parte superficial ou profunda nesses membros torácicos.

As alterações de grau II (Fig.2) incluíram a presença de irregularidades moderadas da superfície óssea do MCIII permitindo a visualização de endentações ósseas quando o transdutor era movimentado no sentido proximodistal; também se observou a diminuição exacerbada do espaço anecóico ocupado pela cartilagem articular. Doze espécimes (40%) foram caracterizados como alterações de grau II, mas dois espécimes (6,66%) não apresentaram alterações significativas nos ligamentos colaterais da articulação MF. Nesta avaliação foi observado envolvimento do LC, normalmente associado ao aspecto onde ocorria à diminuição do espaço articular marginal. Todavia, em alguns espécimes associado a este achado foi observado o comprometimento do LC contralateral do mesmo membro correspondendo ao local o espaço marginal articular se encontrava aumentado de tamanho. As alterações observadas nos LC da articulação MF incluíram a presença de entesófitos em alguns espécimes, e hipoecogenicidade da parte profunda do LC. Em alguns LC havia zonas hipoecogênicas difusas intercaladas com zonas focais hiperecogênicas, bem como perda da forma do mesmo e aumento de tamanho quando comparado ao membro contralateral. Estes achados da parte profunda do LC da articulação MF estavam associados à perda do padrão linear das fibras na porção superficial do mesmo.

Três espécimes avaliados (Fig.3) apresentaram alterações de grau III (10%), que se caracterizavam por severa irregularidade e fragmentação da superfície articular dorsal do MCIII associada à diminuição e ao desaparecimento do espaço regular anecóico ocupado pela cartilagem articular. Em um espécime foi observado fragmentos articulares no aspecto medial e lateral do côndilo do MCIII presos a cápsula articular. Estes três espécimes também apresentaram entesófitos e osteófitos nos aspectos medial e lateral da articulação com comprometimento da parte superficial e profunda dos LC da articulação MF. Em apenas uma amostra foi identificado a presença de osteófitos associado à hipoecogenicidade da parte profunda do LC, sem o comprometimento do LC lateral.

Apenas um espécime (Fig.4) apresentou alteração grau IV (3,33%), caracterizada por anquilose completa da articulação MF sendo a avaliação ultrassonográfica extremamente difícil de ser realizada pela impossibilidade de flexão associado às formações ósseas presentes no aspecto dorsal da mesma. Essas alterações comprometeram também a obtenção de imagens ultrassonográficas dos ligamentos, pela dificuldade de diferenciação entre as estruturas ligamentares e a estrutura ósseas, o que levou a classificação das alterações em grau IV.

Avaliação macroscópica

As alterações de grau I (46,66%) foram caracterizadas por fissuras verticais leves na cartilagem articular, sem exposição do osso subcondral. Macroscopicamente os LC apresentaram diferenças em relação ao seu tamanho. Dois espécimes apresentaram o LC medial parte superficial e profunda aumentada de tamanho em relação ao LC lateral, quatro espécimes apresentaram a relação inversa e dois não apresentaram diferença entre o LC medial e lateral parte superficial e profunda.

Doze espécimes (40%) apresentaram alterações macroscópicas de grau II no côndilo do MCIII aspecto medial e lateral com irregularidades moderadas em relação às observações de grau I, associadas a fissuras horizontais com diminuição expressiva da espessura da cartilagem articular e leve exposição do osso subcondral compatível a leve avermelhamento da superfície óssea. Em alguns espécimes havia endentações ao longo das fissuras horizontais que acompanhavam toda a extensão do côndilo no seu aspecto medial, lateral e crista sagital. Os LC em sua inserção no côndilo do MCIII apresentam áreas fibróticas espessadas focais e difusas de coloração amarela escura associadas em alguns casos a áreas hemorrágicas focais e difusas.

Três espécimes (10%) apresentaram macroscopicamente alterações grau III. Destes, dois tinham fissuras verticais em toda a extensão do côndilo do MCIII e significativa diminuição da espessura da cartilagem articular associada à exposição do osso subcondral. No outro espécime estas fissuras eram horizontais acompanhado das mesmas características descritas acima. Os LC destas peças apresentaram mesmas alterações descritas nas alterações de grau II com a diferença de que nos três membros os LC medial e lateral estavam acometidos.

Na alteração macroscópica de grau IV (3,33%) havia formação óssea e tecidual em toda a superfície articular dorsal do côndilo do MCIII. Nem a cápsula articular nem as inserções dos LC medial e lateral puderam ser identificadas isoladamente. No corte longitudinal realizado com uma serra fita foi observado líquido purulento emergindo do espaço articular associado ao fechamento parcial do espaço articular, acompanhado da mineralização parcial dos LC. Em alguns pontos os LC apresentavam coloração amarelo escuro, não sendo possível a diferenciação entre porção superficial e profunda.

Avaliação microscópica

Baseado nas avaliações anteriores foram selecionadas 45 amostras de LC medial e lateral (porção superficial e profunda) para avaliação microscópica, sendo que as mesmas foram classificadas em alterações leves (35,5%), moderadas (46,7%) e acentuadas (15,5%). Apenas uma amostra (2,22%) não apresentou alterações. A fibroplasia focal, focalmente extensa ou multifocal (Fig. 5) associada ou não a áreas de neovascularização foram visualizadas em 88,9% das amostras. A fibroplasia foi caracterizada pela desorganização das fibras de colágeno denso e pela invasão de tecido conjuntivo frouxo que, em alguns espécimes se apresentava basofílico entre as bandas de tecido conjuntivo denso, associada a presença de áreas neovascularizadas. Em apenas cinco amostras (11,1%) caracterizadas ultrassonograficamente e macroscopicamente como alteração de grau III os LC medial e lateral observou-se fibroplasia associada à metaplasia cartilaginosa. A metaplasia cartilaginosa foi caracterizada pela observação de condrócitos isolados ou agrupados em ninhos envoltos por uma matriz basofílica (condroide). A metaplasia cartilaginosa estava associada em todas as amostras a um tecido conjuntivo frouxo basofílico invadindo o tecido conjuntivo denso. As alterações microscópicas nos cêndilos do MCIII (48,39%, X/n total n=30) variaram de perda leve, moderada e acentuada de camadas de cartilagem, caracterizando o processo de fibrilação cartilaginosa. Sendo observadas áreas multifocais de fibrilação leve a moderada e áreas focalmente extensas de fibrilação leve a moderada. Os espécimes que receberam classificação ultrassonográfica e macroscópica grau III foram compatíveis a áreas focalmente extensas de fibrilação moderada a acentuada. Somente um caso apresentou perda completa da cartilagem articular com exposição de osso subcondral caracterizando o processo de eburnação da cartilagem articular.

Avaliação estatística

As variáveis radiográficas, ultrassonográficas e macroscópicas foram correlacionadas entre si a partir da classificação dos seus espécimes em relação às alterações apresentadas em cada avaliação técnica (Quadro 2).

DISCUSSÃO

No presente trabalho observaram-se diferentes graus de degeneração cartilaginosa associados a alterações dos LC da articulação MF. Na maioria dos espécimes, o LC acometido estava associado a diminuição do espaço articular correspondente, onde havia também osteófitos e/ou entesófitos articulares na avaliação radiográfica e ultrassonográfica. No entanto, concomitantemente, na avaliação US foi observado comprometimento do LC contralateral, ou seja, do lado em que o espaço articular marginal estava aumentado de tamanho devido a diminuição do espaço articular marginal contralateral. Em todas as observações histológicas os LC apresentaram alterações como fibroplasia e metaplasia cartilaginosa em comparação as amostras histológicas controle. Clinicamente as alterações de fibroplasia e metaplasia cartilaginosa focal leve, como as observadas em alguns LC, devem possuir pouca relevância. Contudo, o processo contínuo de degradação cartilaginosa e conseqüentemente a desestabilização articular pode evoluir para um comprometimento mais severo dos LC. Na avaliação ultrassonográfica dos LC da articulação MF deve ser considerado um possível envolvimento articular com base na formação de entesófitos. Ross (1998) descreve que, o desenvolvimento de osteófitos marginais e a formação de entesófitos presos à cápsula articular são achados compatíveis com osteoartrite da articulação MF.

Os achados obtidos na avaliação ultrassonográfica e macroscópica da cartilagem articular do cêndilo do MCIII e dos LC colaterais da MF apresentaram forte correlação ($r^2=0,69$; $p<0,001$), confirmando a contribuição da técnica ultrassonográfica para a avaliação do aspecto dorsal da articulação MF. Isto se tornou evidente ao verificar que, as avaliações US e macroscópicas dos espécimes foram compatíveis em seus graus de alteração. Entretanto, a avaliação radiográfica não demonstrou correlação com as outras técnicas selecionadas para o estudo. O estudo radiográfico revelou diminuição do espaço articular da articulação MF e a presença de fragmentos articulares associados a possíveis lesões de artrose, também observados na avaliação US. A integridade da cartilagem articular e as alterações de LC só foram passíveis de serem diagnosticadas por meio da ultrassonografia. Tradicionalmente, a radiografia é a primeira opção em termos de diagnóstico por imagem a ser utilizada para avaliar a maioria das lesões ósseas que provocam claudicações em equinos (Vanderperren & Saunders 2009), enquanto a ultrassonografia é amplamente utilizada para detectar lesões em tecido moles, como tendões e ligamentos e, mais recentemente na avaliação da articulação MF (Denioix et al. 1996, Redding 2001, Smith & Smith 2008). Devido à alta reflexão do som na interface de tecidos moles, o US se torna ideal para avaliar a superfície de contorno óssea (Cho et al. 2004). A ultrassonografia tem se demonstrado superior à imagem radiográfica na detecção de fragmentos da face óssea dorsal da articulação MF, visto que vários fragmentos possuem aparência hiperecogênica e produzem uma sombra acústica distal subjacente a superfície óssea (Vanderperren & Saunders 2009, Parmar et al. 2010). Alterações na linearidade do osso

subcondral também podem representar lesões (Relave et al. 2009), facilmente diagnosticadas por US como erosões, irregularidades e osteófitos (Denoix et al. 1996).

Os achados ultrassonográficos do aspecto dorsal da articulação MF identificados no presente estudo são: diminuição do espaço ocupado pela cartilagem articular associada a irregularidades ósseas subcondrais do côndilo do MCIII, presença de fragmentos presos ou não a cápsula articular, diminuição de espaço articular com presença ou não de osteófitos e/ou entesófitos. A observação ultrassonográfica transversal permitiu identificar se a irregularidade óssea subcondral do aspecto dorsal da articulação MF era focal ou difusa. Segundo Olive et al. (2009), as endentações no osso subcondral foram frequentemente observadas na superfície lateral, se comparado a medial e na sua grande maioria das vezes estava associada a presença de osteofitose marginal. O envolvimento do osso subcondral no processo de gênese da artrose ainda não está claro (Olive et al. 2009). Logo, a esclerose aumenta a rigidez do osso e transfere este impacto para a cartilagem articular. Por estas razões alguns pesquisadores argumentam que as alterações ósseas são primárias na gênese da osteoartrite e acreditam que as mesmas possam desencadear a degeneração cartilaginosa (Dunstan et al. 1993).

A avaliação macroscópica da articulação metacarpo/metatarsofalangeana de cavalos de corrida revelou defeitos na superfície óssea da face dorsal da articulação MF que variaram de fibrilação, erosão e endentações focais da cartilagem articular à cavitação do osso subcondral, achados estes característicos de osteocondrose traumática (Norrdin et al. 1998). Nas observações macroscópicas da cartilagem articular do côndilo do MCIII, foi possível identificar fissuras que podem ser verticais difusas ou únicas e horizontais que atravessam toda a extensão da superfície óssea do côndilo do MCIII. A intensidade da degeneração cartilaginosa está associada a perda das camadas de cartilagem articular levando a exposição do osso subcondral, com variações de cor que vão de rosa-claro, vermelho-claro a um vermelho mais intenso. Processos avançados de degeneração cartilaginosa se caracterizam pela presença de fibrilação e eburnação, devido à perda total ou progressiva de camadas da cartilagem articular que ultrassonograficamente são representadas pela ausência de um espaço anecóico adjacente ao osso subcondral (De Bastiani et al. 2014). Segundo Vanderperren et al. (2012), osteófitos marginais localizados na periferia da junção osteocondral são um componente conhecido da osteoartrite em equinos, assim como fissuras do osso subcondral são frequentemente observadas macroscopicamente na superfície óssea lateral/medial combinadas com a presença de osteófitos marginais. Ossos são modelados e remodelados ao longo de toda a vida dos equinos em resposta ao exercício, mas em algum momento a readaptação não ocorre (Riggs et al. 1999). O processo final se caracteriza por colapso da cartilagem articular e do osso subcondral devido à sobrecarga contínua (Firth & Rogers 2005). Segundo Cantley et al. (1999), as hipóteses para o desenvolvimento de osteoartrite da articulação MF em animais selvagens podem estar relacionadas à ocorrência natural em função da idade, como aumento da densidade mineral do osso subcondral na eminência proximodorsal da primeira falange e lesões da cartilagem que recobrem a superfície subcondral que se tornam mais severas. Osteoartrites são caracterizadas pela perda e consequente erosão da cartilagem articular, formação de osteófitos periarticulares e alterações em tecidos moles sendo frequentemente observadas na ultrassonografia (Redding 2001).

Os tecidos moles da articulação MF se tornam propensos a lesões devido à instabilidade na hiperextensão medial/lateral ou devido à subluxações. Espessamento dos ligamentos, falta de paralelismo das fibras e alterações de ecogenicidade, são achados ultrassonográficos anormais observados na parte superficial do LC medial/lateral. Ultrassonograficamente, o LC superficial se estende no sentido proximodistal, perpendicular à superfície do côndilo do MCIII e suas fibras são ecogênicas e dispostas vertical e paralelamente em relação a pele, facilmente visualizados no plano longitudinal (Denoix et al. 1996). Nesta avaliação ultrassonográfica de LC da articulação MF se deve observar a presença de envolvimento articular com base na formação de entesófitos. O desenvolvimento de osteófitos marginais e a formação de entesófitos presos à cápsula articular são achados compatíveis com osteoartrite da articulação MF. Esclerose subcondral, defeitos radioluscentes e degeneração cartilaginosa podem ser extensos, mesmo com mínima evidência radiográfica de formação de osteófitos (Ross 1998). Degeneração cartilaginosa é caracterizada pelo espaço anecoico reduzido, que representa tecido cartilaginoso, associado a irregularidades de superfície óssea do côndilo do MCIII em seções ultrassonográficas transversais, sem obrigatoriamente apresentar formação de entesófitos (De Bastiani et al. 2014). Achados histológicos da camada superficial e profunda dos LC de membros torácicos, sem claudicação e sem alterações ultrassonográficas, são caracterizados por desmócitos alongados, embebidos em uma matriz extracelular rica em colágeno, organizada longitudinalmente ao longo do seu eixo. A presença de metaplasia cartilaginosa, em que o tecido cartilaginoso contém pequenas quantidades de cartilagem hialina, caracterizada por uma matriz basofílica homogênea com células condroides arredondadas, representa alterações mais severas (Pohlin et al. 2014). Esta alteração foi observada em 15,62% dos LC

avaliados associada à presença de áreas de fibroplasia e neovascularização; em contrapartida, todas as amostras apresentaram fibroplasia e neovascularização.

As articulações metacarpo/metatarsofalangeana possuem alta mobilidade exigindo desta forma uma complexa rede de estruturas estabilizadoras para suportar as forças de compressão. Os LC medial e lateral limitam a movimentação destas articulações no plano sagital (Richardson 2003). A ruptura traumática ou cirúrgica dos LC resulta em instabilidade articular e maior probabilidade de osteoartrite (Yovich et al. 1987). Neste estudo foi observado que alterações leves, moderadas a severas e muito severas da cartilagem articular estavam associadas a alterações ultrassonográficas, macroscópicas e histológicas dos LC.

CONCLUSÕES

Alterações articulares como diminuição de espaço articular, associada à presença de osteófitos marginais, irregularidades de superfície óssea e diminuição do espaço ocupado pela cartilagem articular, bem como a fibrilação multifocal e ou focalmente extensa da cartilagem articular estão associadas à fibroplasia, neovascularização e metaplasia cartilaginosa dos LC medial e lateral. Para a avaliação da degeneração cartilaginosa associada às alterações dos LC a técnica ultrassonográfica se mostrou mais sensível que a radiográfica.

Agradecimentos.- Clínica Hípica (Dr. Jarbas Castro Jr – *in memorian*)

REFERÊNCIAS

- Barone R. 1989. Articulations metacarpal-phalangiennae, p.187-204. In: Anatomies des Mammifères Domestiques – Tome 2: Arthrologie et Myologie. Vigot, Paris.
- Cantley C., Firth E.C., Delahunt J.W., Pfeiffer D.U. & Thompson K.G. 1999. Naturally occurring osteoarthritis in the metacarpophalangeal joints of wild horses. *Equine Vet J.* 31(1):73-81.
- Cho K.H., Lee Y.H., Lee S.M., Shahid M.U., Suh K.J. & Choi J.H. 2004. Sonography of bone and bone-related diseases of the extremities. *J. Clin. Ultrasound.* 32(9):511-521.
- Denoix J.M., Jacot S., Bousseau B. & Perrot P. 1996. Ultrasonographic anatomy of the dorsal and abaxial aspects of the equine fetlock. *Equine Vet J.* 28(1):54-62.
- De Bastiani G., De La Côte F.D., Brass K.E., Kommers G.D. & Denoix J.M. 2014. Association of ultrasound and anatomopathologic findings of equine metacarpophalangeal lesions. *J. Equine Vet. Sci.* 34:1218-1225.
- Dunstan C.R., Somers N.M. & Evans R.A. 1993. Osteocyte death and hip fracture. *Calcif. Tissue Int.* 53:113-117.
- Firth E.C. & Rogers C.W. 2005. Musculoskeletal responses of 2-year-old Thoroughbred horses to early training. *Conclusions. N. Z. Vet. J.* 53(6):377-383.
- Murray R.C., Vedi S., Birch H.L., Lakhani K.H. & Goodship A.E. 2001. Subchondral bone thickness hardness and remodeling are influenced by short-term exercise in a site-specific manner. *J. Orthop. Res.* 19(6):1035-1042.
- Norrdin R.W., Kawcak C.E., Capwell B.A. & McIlwraith C.W. 1998. Subchondral bone failure in an equine model of overload arthrosis. *Bone.* 22(2):133-139.
- Olive J., D'Anjou M.A., Girard C., Laverty S. & Theoret C.L. 2009. Imaging and histological features of central subchondral osteophytes in racehorses with metacarpophalangeal joint osteoarthritis. *Equine Vet J.* 41(9):859-864.
- Park R.D., Steyn P.F. & Wrigley R.H. 1996. Imaging techniques in the diagnosis of equine joint disease, chapter 9, p.150-151. In: McIlwraith C.W. & Trotter W.B. *Joint Disease in the horse.* Saunders, Philadelphia.
- Parmar B.J., Longsine W., Sabonghy E.P., Han A., Tasciotti E., Weiner B.K., Ferrari M. & Righetti R. 2010. Characterization of controlled bone defects using 2D and 3D ultrasound imaging techniques. *Phys. Med. Biol.* 55(16):4839-4859.
- Pohlin F., Edinger J., Jenner F. & Egerbacher M. 2014. Anatomic and histologic features and ultrasonographic appearance of collateral ligaments of the metacarpophalangeal joints in cadaveric limbs from horses without lameness. *Am. J. Vet. Res.* 75(12):1089-1098.
- Radin E.L., Burr D.B., Caterson B., Fyhrie D., Brown T.D. & Boyd R.D. 1991. Mechanical determinants of osteoarthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 21(3):12-21
- Radtke C.L., Danova N.A., Scollay M.C., Santschi E.M., Markel M.D., Da Costa Gómez T. & Muir P. 2003. Macroscopic changes in the distal ends of the third metacarpal and metatarsal bones of Thoroughbred racehorses with condylar fractures. *Am. J. Vet. Res.* 64(9):1110-1116.

- Relave F., Meulyzer M., Alexander K., Beauchamp G. & Marcoux M. 2009. Comparison of radiography and ultrasonography to detect osteochondrosis lesions in the tarsocrural joint: A prospective study. *Equine Vet. J.* 41(1):34-40.
- Redding W.R. 2001. Use of ultrasonography in the evaluation of joint disease in horses. Part 2: Examination of the articular surface. *Equine Vet. Educ.* 13(5):275-280.
- Riggs C.M., Whitehouse G.H. & Boyde A. 1999. Pathology of the distal condyles of the third metacarpal bones of the horse. *Equine Vet. J.* 31(2):140-148.
- Richardson D.W. 2003. The metacarpophalangeal joint, p.348-362. In: Ross M.W. & Dyson S.J. *Diagnosis and management of lameness in the horse*. Philadelphia, Saunders.
- Ross M.W. 1998. Scintigraphic and clinical findings in the Standardbred metatarsophalangeal joint: 114 cases (1993-1995). *Equine Vet. J.* 30(2):131-138.
- Santschi E.M. 2008. Articular fetlock injuries in exercising horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 24(1):117-132.
- Smith M. & Smith R. 2008. Diagnostic ultrasound of the limb joints, muscle and bone in horses. In *Pract.* 30:152-159.
- Yovich J.V., Turner A.S., Stashak T.S. & McIlwraith C.W. 1987. Luxation of the metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints in horses. *Equine Vet. J.* 19(4):295-298.
- Vanderperren K. & Saunders J.H. 2009. Diagnostic imaging of the equine fetlock region using radiography and ultrasonography. Part 2: The bony disorders. *Vet. J.* 181(2):123-136.
- Vanderperren K., Gielen I., Van Caelenberg A., Van der Vekens E., Raes E.V., Hauspie S., van Bree H. & Saunders J.H. 2012. Ultrasonographic appearance of bony abnormalities at the dorsal aspect of the fetlock joint in geriatric cadaver horses. *Vet. J.* 193(1):129-134.

Figuras e legendas



Fig.1. Espécimes do MT equino submetidos a uma prensa hidráulica para a realização das projeções radiográficas.

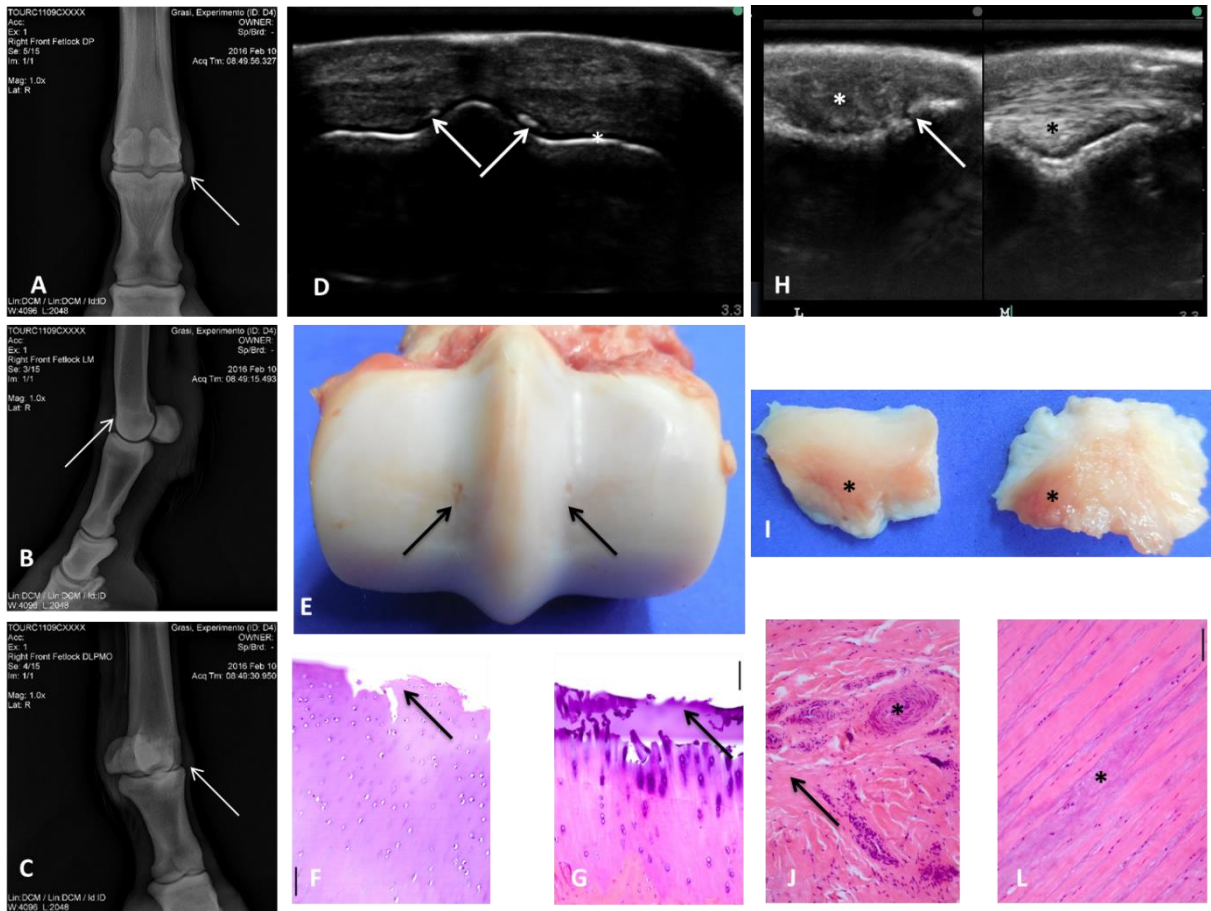


Fig.2. (A) Projeção radiográfica DP da articulação MF- esclerose de osso subcondral [seta]. (B) Projeção radiográfica LM da articulação MF- osteófito periarticular [seta]. (C) Projeção radiográfica DLPMO da articulação MF- osteófito periarticular [seta]. (D) Secção transversal US da articulação MF [medial à esquerda e lateral à direita]- Fragmentação e irregularidade óssea da superfície do côndilo do MCIII [seta]. Diminuição do espaço ocupado pela cartilagem articular [asterisco]. (E) Côndilo do MCIII- fissuras verticais [seta]. (F) H&E - fibrilação da cartilagem articular do côndilo do MCIII [seta]. Objetiva 20x. (G) Azul Alciano- área de fibrilação da cartilagem articular do côndilo MCIII associada a fraca coloração azul [seta]. Objetiva 20x. (H) Secção US longitudinal da fossa côndilar do MCIII [proximal à esquerda e distal à direita] - LC lateral [imagem a esquerda] irregularidade da superfície óssea do MCIII associada a diminuição de espaço articular marginal e a presença de osteófitos [seta]. Espessamento e hipocogenidade alternada por áreas ecogênicas da porção profunda do LC lateral [asterisco]. LC medial [imagem a direita] - espessamento da porção profunda [asterisco]. (I) LC lateral [esquerda] - área de coloração avermelhada difusa [asterisco]. LC medial [direita] - área de coloração avermelhada focal [asterisco]. Objetiva 20x. (J) H&E - LC lateral- neovascularização (asterisco) e fibroplasia (seta). Objetiva 20x. (L) H&E - LC medial - fibroplasia [asterisco]. Objetiva 20x.

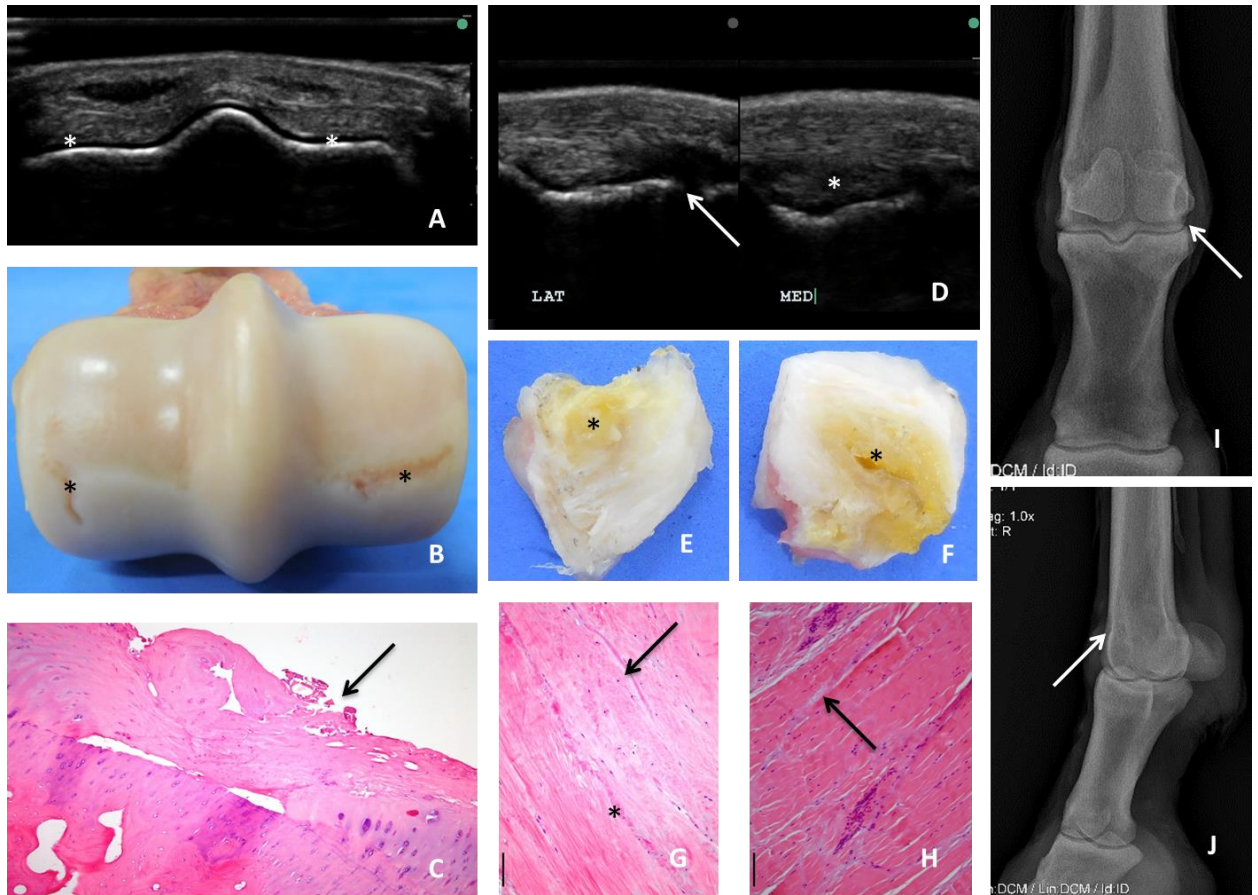


Fig.3. (A) Secção US transversal do aspecto dorsal da articulação MF. Medial a esquerda e lateral a direita. Irregularidade da superfície óssea e diminuição do espaço ocupado pela cartilagem articular medial e lateral [asterisco]. (B) Côndilo do MCIII- fissuras horizontais [asterisco]. (C) H&E- Fibrilação da cartilagem articular do côndilo do MCIII associada a fragmentação da mesma [seta]. Objetiva 20x. (D) Secção longitudinal US da fossa cônica do MCIII. LC lateral e medial. Proximal a esquerda e distal a direita. Espessamento do ligamento colateral medial porção profunda [asterisco] associado a diminuição de espaço marginal lateral [seta]. (E) LC lateral [porção profunda] área fibrótica circular delimitada amarelo escuro [asterisco]. (F) LC medial [porção profunda] área fibrótica difusa amarelo escuro [asterisco]. (G) H&E- LC lateral com condrócitos isolados [seta] e fibroplasia [asterisco]. Objetiva 20x. (H) H&E- LC medial com áreas de fibroplasias [seta]. Objetiva 20x. (I) Projeção radiográfica DP da articulação MF- diminuição de espaço marginal lateral associado a presença de osteófito [seta]. (J) Projeção radiográfica DMPLO da articulação MF- osteófito periarticular [seta].

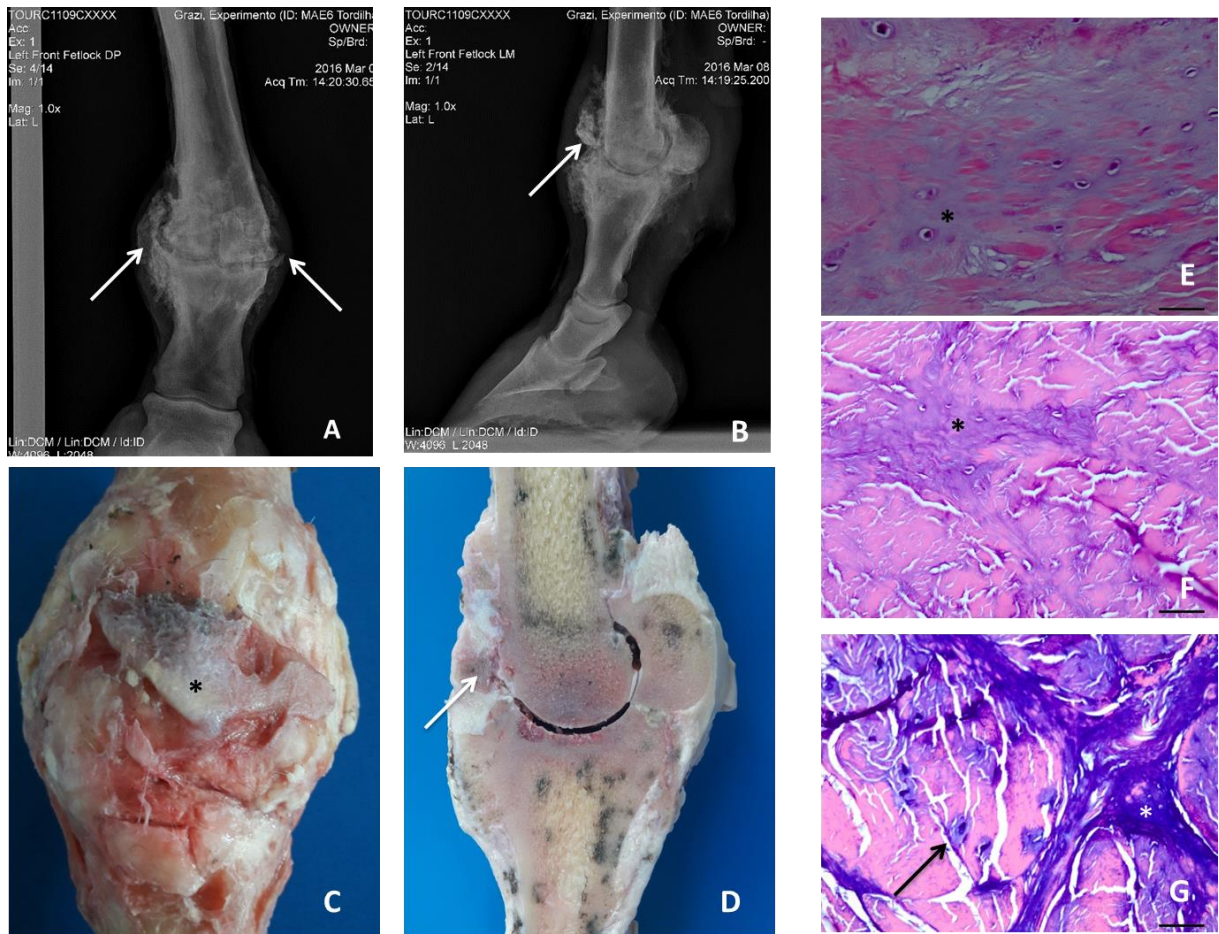


Fig.4. A- Severa diminuição de espaço articular [subluxação] associado a ostólise de osso subcondral e osteófitos periarticulares [seta]. (B) Proliferação óssea severa (seta). (C) Face dorsal do côndilo MCIII- proliferação óssea exacerbada [asterisco]. (D) Secção longitudinal do côndilo do MCIII- proliferação óssea associada a anquilose articular [seta]. (E) H&E- condrócito [seta] circundado por uma matriz basofílica correspondente a área de fibroplasia [asterisco]. Objetiva 20x. (F) H&E - fibroplasia [asterisco]. Objetiva 20x. (G) Azul alciano - matriz azul alciano positiva [asterisco] correspondente a metaplasia cartilaginosa [seta]. Objetiva 20x.

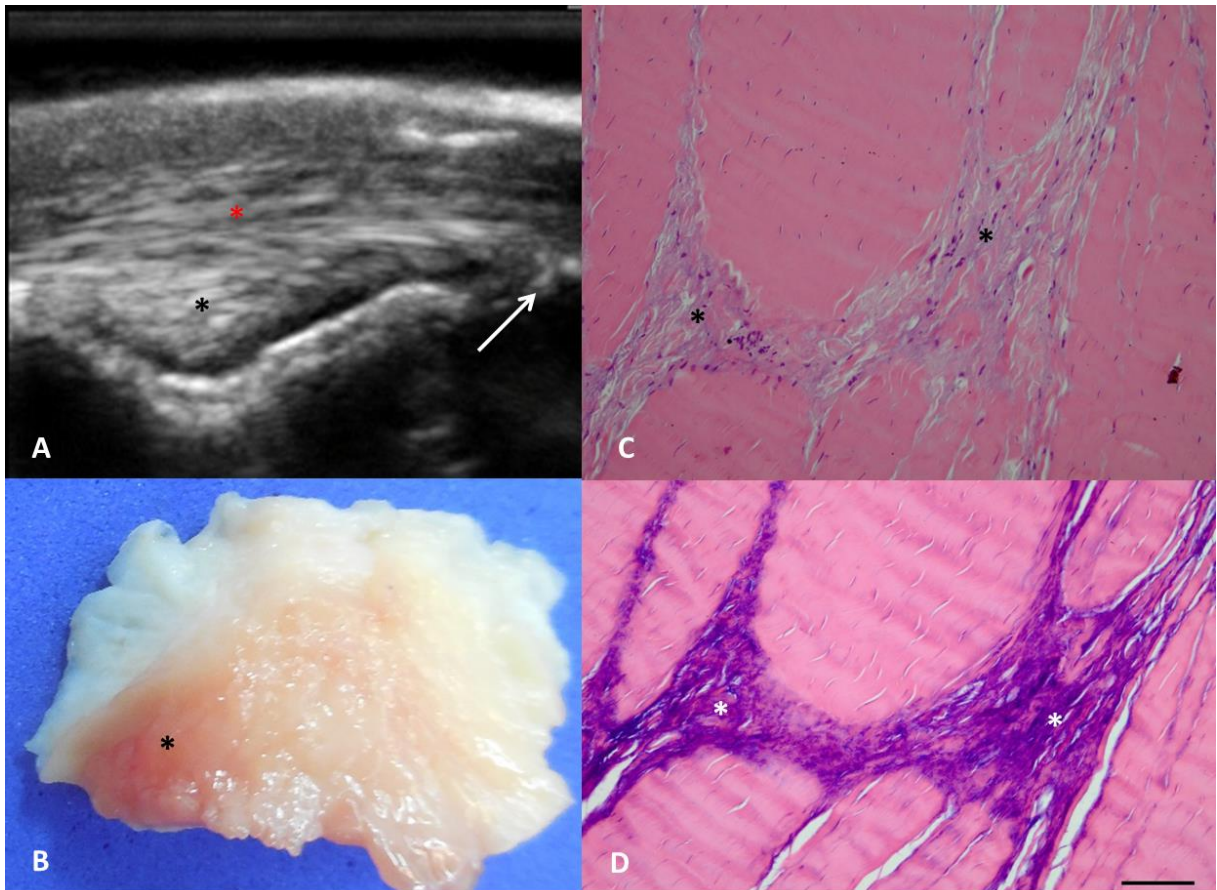


Fig.5. (A) Secção longitudinal da fossa cônica do MCIII [proximal a esquerda e distal a direita]. Porção profunda espessada [asterisco preto] porção superficial [asterisco vermelho] associado à presença de osteófito marginal [seta]. (B) LC medial porção profunda - área avermelhada difusa e espessada. (C) H&E - LC medial porção profunda - fibroplasia [asteriscos]. Objetiva 20x. (D) Azul alciano - LC medial porção profunda- matriz azul alciano positiva. Objetiva 20x.

Lista de quadros

Quadro 1 – Relação de achados ultrassonográficos e macroscópicos

Classificação	Ultrassom	Macroscópico
0- Sem alterações	Não apresenta alterações US.	Não apresenta alterações macroscópicas.
I- Leve	Leve irregularidade da superfície óssea do MCIII; leve diminuição do espaço ocupado pela cartilagem articular.	Fissuras verticais leves na superfície do MCIII.
II- Moderada	Moderada irregularidade associada a endentações da superfície óssea do MCIII; diminuição do espaço ocupado pela cartilagem articular. Presença de osteófitos e entesófitos. Alterações dos LC.	Fissuras horizontais com diminuição expressiva da cartilagem articular associado a áreas vermelhas da superfície do MCIII. Os LC apresentam áreas fibróticas a hemorrágicas.
III- Severa	Severa irregularidade associada a fragmentações da superfície óssea do MCIII; diminuição e desaparecimento espaço ocupado pela cartilagem articular. Presença de osteófitos e entesófitos. Alterações dos LC.	Mesmas características citadas anteriormente associadas a exposição do osso subcondral do MCIII.
IV- Muito Severa	Colápsio completo dos espaços articulares associado a intensa proliferação óssea. Não ocorre diferenciação das estruturas ligamentares. Não se observa a cartilagem articular.	Proliferação óssea e tecidual do aspecto dorsal da MF. Mineralização dos LC.

MCIII: terceiro osso metacarpiano; MF: articulação metacarpofalangeana; LC: ligamentos colaterais.

Quadro 2 – Correlação de Pearson entre o diagnóstico radiológico, ultrassonográfico e macroscópico de lesões degenerativas cartilagosas e entesopatias dos ligamentos colaterais da articulação MF.

Avaliação	Raio X	Ultrassom	Macroscópico
Raio X	1	0,47 ^{ns}	0,47 ^{ns}
Ultrassom		1	0,83 ^{***}
Macroscópico			1

^{ns}Não significativo; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

5. ARTIGO 3

Trabalho a ser submetido para publicação:

Caracterização ultrassonográfica, macroscópica e histológica da inserção proximal do ligamento suspensório em cavalos Crioulos

Grasiela De Bastiani, Flavio De La Côte, Karin Erica Brass, Camila Cantarelli, Ligia Maria Mouri Malfestio, Daniela Schwingel, Taiara Muller da Silva e Glaucia Denise Kommers

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, 2017

Caracterização ultrassonográfica, macroscópica e histológica da inserção proximal do ligamento suspensório em cavalos Crioulos¹

Grasiela De Bastiani^{2*}, Flávio Desessards De La Côte², Karin Erica Brass², Camila Cantarelli², Lúgia Maria Mouri Malfestio³, Daniela Schwingel³, Taiara Muller da Silva⁴, Gláucia Denise Kommers⁴

ABSTRACT.- De Bastiani G., De La Corte F.D., Brass K.E., Cantarelli C., Malfestio L.M.M., Schwingel D., Silva T.M. & Kommers G.D. 2017. [Ultrasonographic, macroscopic and histological characterization of the proximal insertion of the suspensory ligament in Crioulo horses.] Caracterização ultrassonográfica, macroscópica e histológica da inserção proximal do ligamento suspensório em cavalos Crioulos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: grasibage@hotmail.com.

Although a routine diagnostic modality, the ultrasonography still has some limitations for the diagnosis of lesions as in the proximal insertion of the suspensory ligament (PISL) because of its composition that includes muscle fibers and adipose tissue immersed between the ligament fibers. The objective of the present study was to describe the ultrasonographic, macroscopic and histological aspects of the PISL of thoracic limbs (TL) and pelvic limbs (PL) of Crioulo horses (CH). We selected 34 specimens of TL (right and left) and 10 specimens of PL of horses with a mean age of 5.7 years, from a private clinic or destined to the Department of Veterinary Pathology of UFSM, who died due to different causes. The animals had no previous history of lameness in selected limbs related to the PISL injuries. The 34 specimens of the PISL TL were divided by CH (n = 25) and Thoroughbred horses (TGH) (n = 9), which served as the control group, and 11 specimens of PL PISL divided into CH breed (n = 8) and TGH (n = 3), also as control group. The US examination was performed in the PISL with a *Sonosite Edge* machine, 5-10 MHz linear transducer, with transverse and longitudinal palmaromedial and palmarolateral images of the proximal face of the metacarpal (MC) III, II and IV. In PL, the evaluation was performed four centimeters below the chestnut in the plantaromedial aspect of metatarsal III and II (MTIII / MTII). PISL lobulated form and size compared to the contralateral limb, as well as the regularity of the palmar bone surface of MC III, II, IV, were also observed. Subsequently, the dissection of the PISL lobes was performed, as well as its macroscopic evaluation, which preceded the histological processing of the samples. In specimens of the CH breed, PISL has an echogenicity that varies from peripheral dorsal hyperechogenic zones that merge into echogenic and hypoechogenic zones where its lobulation occurs. In the samples from the TGH group, PISL is also lobulated, but with differences in the echogenicity pattern such as diffuse hypoechogenicity and echogenicity. Macroscopically, CH samples presented a large amount of adipose tissue that corresponds to the dorsal peripheral zone of PISL, which ends in the connective tissue that delimits the ligamentous lobes. On a macroscopic cross section of PISL, muscle fibers in red are mixed to white ligament fibers at the center of the ligament. This macroscopic finding was not observed in TGH, where muscle fibers overlap the ligament fibers throughout the ligament extension and small amounts of fat are present in the dorsal periphery of the ligament. PISL in PL has a triangular shape with echogenicity characteristics very similar to those mentioned in the thoracic limb. In ultrasonographic, macroscopic and histological evaluation, PISL samples in TL and PL of CH demonstrated a higher amount of peripheral dorsal adipose tissue, as well as a greater amount of ligament and muscle fibers merged, compared to TGH.

INDEX TERMS: suspensory ligament; ultrasound; macroscopy; histology; equine.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Clínica de Grandes Animais, Hospital Veterinário Universitário (HVU), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Campus Universitário, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: grasibage@hotmail.com

³ Departamento de Histologia, IMED, Rua Senador Pinheiro, Campus Passo Fundo, RS, 99070-220, Brasil.

⁴ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFSM, Av. Roraima 1000, Campus Universitário, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

RESUMO.- Embora uma modalidade diagnóstica rotineira, a ultrassonografia ainda possui algumas limitações para o diagnóstico de lesões como as que afetam a inserção proximal do ligamento suspensório (IPLS). Uma dessas limitações é relacionada à composição desse ligamento que inclui fibras musculares e tecido adiposo intercalados entre as fibras ligamentares. O objetivo do presente trabalho foi descrever os aspectos ultrassonográficos (US), macroscópicos e histológicos da IPLS de membros torácicos (MT) e membros pélvicos (MP) de equinos da raça crioulo (CC). Foram selecionados 34 espécimes de MT (direito e esquerdo) e 10 espécimes de MP de equinos com idade média de 5,7 anos, que morreram por diferentes causas, oriundos de uma clínica privada ou destinados ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM. Não havia histórico prévio de claudicações nos membros selecionados que pudessem estar relacionadas a lesões da IPLS. Os 34 espécimes da IPLS MT foram divididos pela raça CC (n= 25) e Puro Sangue Inglês (PSI) (n=9), o qual serviu como grupo controle e, 11 espécimes da IPLS do MP divididos em raça CC (n=8) e PSI (n=3) também como grupo controle. O exame US foi realizado na IPLS com um aparelho *Sonosite Edge*, transdutor linear de 5-10 MHz, com imagens transversais e longitudinais palmaromedial e palmarolateral da face proximal do metacarpiano (MC) III, II e IV. No MP a avaliação foi realizada quatro centímetros abaixo da castanha no aspecto plantaromedial do metatarsiano III e II (MTIII / MTII). Foram também observadas a forma lobulada da IPLS e o tamanho em comparação ao membro contralateral, bem como a regularidade da superfície óssea palmar do MC III, II, IV. Posteriormente foi realizada a dissecação dos lobos IPLS, bem como a avaliação macroscópica dos mesmos que antecedeu o processamento das amostras para histologia. Em espécimes CC, a IPLS possui uma ecogenicidade que varia de zonas periféricas dorsais hiperecogênicas que se mesclam a zonas ecogênicas e hipoeecogênicas onde ocorre a sua lobulação. Nas amostras do grupo PSI, a IPLS também é lobulada, mas com diferenças no padrão de ecogenicidade como, hipoeecogenicidade e ecogenicidade difusas. Macroscopicamente, as amostras CC apresentaram uma grande quantidade de tecido adiposo que corresponde à zona periférica dorsal da IPLS, a qual termina no tecido conjuntivo que delimita os lobos ligamentares. Em uma secção transversal macroscópica da IPLS as fibras musculares em vermelho se mesclam as fibras ligamentares brancas no centro do ligamento. Este achado macroscópico não foi observado na raça PSI, onde as fibras musculares intercalam as fibras ligamentares em toda a extensão do ligamento e pequenas quantidades de gordura estão presentes na periferia dorsal do mesmo. A IPLS no MP possui um formato triangular com características de ecogenicidade muito similares as citadas no MT. Na avaliação US, macroscópica e histológica as amostras da IPLS em MT e MP de equinos na raça CC demonstraram uma maior quantidade de tecido adiposo dorsal periférico bem como, uma maior quantidade de fibras musculares e ligamentares mescladas em comparação às amostras PSI.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: ligamento suspensório, ultrassom, macroscopia, histologia, equino.

INTRODUÇÃO

A claudicação originada no ligamento suspensório (LS) é um achado comum em cavalos de esporte (Dyson 1991). Muitas publicações têm como tema principal o diagnóstico, ocorrência e alternativas de tratamento para as desmites proximais do LS. Entretanto, quando consideramos a principal modalidade de diagnóstico, a ultrassonografia, as alterações do LS relacionadas à sua estrutura e a sua forma nem sempre podem ser facilmente diferenciadas de achados normais (Zauscher et al. 2013).

No membro torácico (MT) o LS origina-se no aspecto palmaroproximal do MCIII (Gibson & Steel 2002) e no III carpiano (Werpy et al. 2013). No membro pélvico (MP), o LS surge na fileira distal dos ossos tarsais e no aspecto plantaroproximal do MTIII (Gibson & Steel 2002) e possui um formato triangular (Werpy et al. 2013). Uma porção adicional proveniente do calcâneo também é descrita (Schulze 2007, Schulze & Budras 2008).

A ultrassonografia é a modalidade de imagem mais frequentemente utilizada para avaliação do aparelho suspensório (Carnicer et al. 2012). Embora tenha sido a modalidade de imagem indicada para a avaliação de tendões e ligamentos conforme Denoix (1994), a interpretação das imagens ultrassonográficas da inserção proximal do ligamento suspensório (IPLS) pode se tornar um desafio em consequência da diversidade de ecogenicidade encontrada nessa região específica. Essa diversidade se deve ao surgimento de artefatos em função da composição histológica única do LS que apresenta fibras musculares, o que inclusive o faz ser chamado de músculo interósseo III (Budras et al. 2003). Tal observação também decorre das diferentes propriedades acústicas dos diferentes tecidos que o compõem (O'Neil 2008). As fibras musculares possuem menor ecogenicidade que as fibras ligamentares, criando uma variação de ecos na IPLS normal (Agut et al. 2009). Além de fibras musculares há também tecido adiposo o qual é, em geral, hiperecogênico (Bischofberger et al. 2006). Contudo, muitas vezes, o tecido adiposo é intercalado às fibras musculares dentro dos fascículos ligamentares, contribuindo para uma

variação de ecogenicidade do LS (Scharamme et. al. 2012). A IPLS é constituída por uma forte banda tendinosa contendo uma quantidade variável de tecido muscular e tecido adiposo (Dyson 1998). A IPLS é composta por fascículos musculares cercados pelo tecido conjuntivo denso, ou especificamente feixes de colágeno em arranjo paralelo de fibras. O tecido conjuntivo frouxo circundante dificilmente poderia ser descrito como o clássico perímio, pois possui características similares ao tecido que circunda o tecido tendinoso (Soffler et al. 2006).

A rotina da avaliação US da IPLS do CC acarreta muitas dúvidas em sua interpretação, devido à carência de informações sobre a sua composição tecidual que influencia diretamente no seu padrão ecogênico. Para tanto, o objetivo deste trabalho é descrever a associação dos achados ultrassonográficos, macroscópicos e histológicos, proporcionando desta forma uma caracterização mais precisa da IPLS na raça CC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados trinta e quatro espécimes da IPLS do MT e onze do MP das raças CC e PSI que, foram utilizados como amostras controle. Esses espécimes eram provenientes de animais que foram a óbito por causas diversas, em uma clínica equina privada da região sul do Brasil ou de equinos encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. A idade média dos animais foi de 5,7 anos de idade. Para obtenção dos MT, esses foram desarticulados na região intercarpiana e para obtenção dos MP, esses foram desarticulados na articulação intertarsiana proximal. Depois de congeladas na origem, os espécimes foram enviados à Universidade Federal de Santa Maria e acondicionados a 4°C graus. A ultrassonografia foi o método de diagnóstico por imagem escolhido para a caracterização da ecogenicidade, tamanho, forma e arquitetura da IPLS da raça CC e as imagens foram comparadas e obtidas sob as mesmas condições de membros oriundos do grupo PSI. Os espécimes foram tricotomizados na região proximopalmar no MT e proximoplantar medial abaixo da castanha no MP. Para facilitar a passagem das ondas US as peças foram submersas em água morna e se utilizou gel para melhor cooptação do transdutor à pele. Um *stand-off pad* foi acoplado ao transdutor para ampliar a superfície de contato entre o transdutor e a estrutura a ser avaliada. As imagens ultrassonográficas foram produzidas com um aparelho *Sonosite* equipado com um transdutor linear 5-10 MHz. A avaliação da IPLS no MT foi realizada por meio de três abordagens, uma secção transversal proximopalmar com o intuito de observar os dois lobos em conjunto e a superfície óssea do MCIII na mesma imagem e, num segundo momento, cada lobo separadamente em uma abordagem palmaromedial e palmarolateral e uma secção longitudinal e transversal, examinando-se a entese do MCIII entre o MCII e MCIV. No MP se utilizou uma abordagem palmaromedial, com uma secção transversal e outra longitudinal, aproximadamente quatro centímetros (cm) abaixo da castanha. Para facilitar a abordagem US e manter o apoio dos membros similar à biomecânica normal em estação, os espécimes foram colocados em uma prensa hidráulica sob a força de 400 a 500 kg. Critérios como ecogenicidade, tamanho, forma, arquitetura e entese da IPLS na raça CC e PSI nos MT e MP foram avaliados. Foram selecionados para o estudo macroscópico e histológico espécimes de ambas raças que não apresentaram alterações US na IPLS. Em seguida os lobos medial e lateral da IPLS foram dissecados na região proximopalmar do MT, aproximadamente dois cm abaixo da articulação carpometacarpiana; no MP, os espécimes foram dissecados na região proximopalmar medial quatro cm abaixo da castanha. Os lobos medial e lateral da IPLS no MT foram seccionados em cortes transversais, bem como o arredondado lobo no MP e, fotografados para documentação. Posteriormente, as amostras foram fixadas em solução de formol tamponada a 10% durante um período de 14 dias. As amostras de tecidos moles foram rotineiramente processadas para histologia em secções de 3µm e foram coradas pela hematoxilina-eosina. Posteriormente, foi realizada a avaliação morfométrica das variáveis como tecido conjuntivo denso, tecido conjuntivo frouxo, tecido adiposo e fibras musculares da IPLS e comparadas entre o grupo CC e PSI.

Análise Estatística

Com o intuito de linearizar os dados, as variáveis tecido conjuntivo denso (TCD), tecido conjuntivo frouxo (TCF), tecido adiposo e fibras musculares foram transformadas em numéricas e posteriormente em escore linear ($EL = [\log_2(\text{variável})]+3$). Após a transformação em EL, as variáveis dependentes (TCMD, TCF, tecido adiposo e fibras musculares) foram testadas quanto à normalidade residual pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene. Posteriormente, foram submetidas à análise de variância univariada pelo procedimento de modelos lineares gerais (PROC GLM) em delineamento inteiramente casualizado. Em seguida, as médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários com o comando LSMEANS (*Least Squares Means*) e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram executadas no aplicativo SAS® System for Windows™ versão 9.0 (Quadro 1).

RESULTADOS

Trinta e quatro espécimes da inserção proximal LS do MT foram divididos em CC (73,52%, X/n total n=25) e PSI (26,37%, X/n total n=9). No membro pélvico, 11 espécimes foram utilizados sendo CC (72,77%, X/n total n=8) e PSI (27,27%, X/n total n=3).

Avaliação Ultrassonográfica

As superfícies do MCIII, MCII e MCIV de alguns espécimes apresentaram irregularidades leves, entretanto os mesmos foram incluídos nesse estudo por não apresentaram fragmentações ósseas e ou, alterações relacionadas a ecogenicidade, forma, tamanho e arquitetura da IPLS.

A IPLS CC possui um formato lobulado similar à raça PSI. Em relação ao tamanho, se observa que 73,52% da IPLS da raça CC não possui diferença entre seus lobos. No entanto, em 26,47% o lobo medial é maior em comparação ao lobo lateral assim como ocorre no PSI. A ecogenicidade da IPLS de CC (Fig. 1-A) é caracterizada por uma hipoecogenicidade que acompanha a região periférica dorsal do mesmo. Esta hipoecogenicidade acompanha o ponto onde ocorre a lobulação da IPLS. Os lobos são ecogênicos, entremeados por alguns pontos hipoecogênicos. No grupo PSI (Figura 2-A), em comparação ao grupo CC, à região periférica dorsal, lobulada que entra em contato direto com o MCIII, MCII e MCIV se apresenta ecogênica. Os lobos da IPLS do grupo PSI são ecogênicos, intercalados com áreas hipoecogênicas em maior intensidade, quando comparados à IPLS do CC. Na incidência negativa sobre a IPLS de CC (Fig.1-B e 1-C) se notam algumas linhas e pontos hiperecogênicos em toda a sua periferia e que, em alguns espécimes, estas linhas partem da periferia alcançando o interior do lobo. As mesmas, não são ângulo-negativo dependente. No grupo PSI esta situação não ocorre (Fig.2-B e 2-C), somente alguns pontos hiperecogênicos sutis são observados na periferia do LS. Em alguns espécimes oriundos de animais CC mais jovens (3,0 anos media), a área hipoecogênica que acompanha toda a periferia dorsal do LS é ecogênica. Em um espécimen, com mais ou menos seis meses de idade, esta situação não ocorre e sim, a periferia dorsal é marcadamente hipoecogênica como descrito anteriormente.

No MP, a IPLS da raça CC, possui um formato arredondado e está disposto sob a superfície óssea do MTIII e a entese do MTII, a IPLS na raça CC (Figura 3-A) é ecogênica, intercalada por pontos hipoecogênicos. Na superfície dorsal da mesma existe uma região hipoecogênica bem delimitada que está em íntimo contato com a superfície óssea do MTIII. No grupo PSI (Fig.4-A) a superfície dorsal é ecogênica e se observou o ligamento em formato triangular. Em alguns espécimes de cavalos CC e PSI, zonas hiperecogênicas pouco delimitadas estão presentes no interior do LS e também se observam linhas hiperecogênicas mescladas no interior do mesmo.

Avaliação Macroscópica

A IPLS do MT foi observada em secções transversais, a partir da dissecação proximopalmar da pele, o tendão flexor digital superficial, o tendão flexor digital profundo e da brida carpiana. Macroscopicamente, a IPLS de CC (Fig.1-D) é dividida em dois lobos bem definidos, um medial e um lateral, não se observando diferença de tamanho e forma entre os lobos. Nos espécimes do grupo PSI, o lobo lateral é mais arredondado (Fig.2-D) e proeminente ao lobo medial que se encontra mais achatado e fino. A IPLS se encontra em contato direto com o MCIII e sua entese entre o MCII e MCIV. Na dissecação de espécimes do grupo CC notou-se uma moderada camada de tecido adiposo em contato com a brida carpiana. Quando os mesmos, são observados em uma secção transversal, se evidencia uma espessa camada de tecido adiposo na periferia dorsal do LS (Figura 1-D), a qual possui uma coloração amarelada e preenche também o local onde ocorre a lobulação do LS. Muitas vezes o tecido adiposo também está bem demarcado no interior dos lobos. Em contrapartida, nas amostras de PSI não se observou tecido adiposo na periferia dorsal. Em alguns casos da raça PSI se nota, uma fina camada de tecido adiposo na periferia ventral do ligamento. Em apenas um espécime de PSI a localização da gordura foi similar ao encontrado nas amostras de CC. A coloração da IPLS em CC varia de um vermelho claro a esbranquiçado com seus fascículos bem demarcados por um tecido branco perolado, similar ao que se observa no tecido tendinoso. O tecido branco perolado em alguns casos também pode ser observado na periferia do ligamento. A artéria e veia palmar podem ser encontradas e estão sustentadas pelo tecido adiposo e por este tecido branco perolado junto a IPLS. As amostras do grupo PSI possuem uma coloração e organização dos fascículos similares às descritas nas amostras do grupo CC.

Foram realizadas secções transversais de espécimes da IPLS no MP acessando-se o aspecto plantaromedial, a fim de observar a forma, a arquitetura fascicular e, a coloração dos tecidos que o compõem comparando-se o grupo CC e grupo PSI. A forma da IPLS nas amostras de CC é arredondada (Fig.3-B) e do grupo PSI é triangular e a coloração de ambos varia de um vermelho claro e em alguns casos se observou o mesmo, difusamente esbranquiçado. Os fascículos são nitidamente demarcados por um tecido branco perolado. No grupo PSI (Fig.4-B) se observa uma espessa camada deste tecido na periferia

dorsal do LS. Em contrapartida, na região periférica da IPLS de CC se identifica uma espessa camada de tecido adiposo amarelado. O tecido adiposo nestes espécimes de CC também está focalmente localizado no interior do LS.

Avaliação histológica

Nas amostras do MT a IPLS é composta por TCMD onde se encontram as fibras colágenas (Fig.1-E e 2-H). Este tecido é delimitado por um TCF o que resulta na formação dos fascículos similar ao peritêndão que é observado no tecido tendinoso. Os adipócitos estão presentes em uma proporção elevada na região periférica dorsal do LS, na sua origem, preenchendo o espaço formado pela sua lobulação (Fig.1-F). Os adipócitos também estão presentes no interior dos lobos e, em algumas amostras, delimitados por fascículos de fibras musculares e pelo TCMD (Fig.1-G e 1-H), TCF e TCMD (Fig.1-I). Observam-se numerosos gânglios nervosos (Fig.1-I) e vasos sanguíneos (Fig.1-J) entre os adipócitos localizados na periferia dorsal. Os fascículos de fibras musculares compõem ambos os grupos e principalmente localizadas focalmente no interior dos lobos circundando o TCMD e o TCF (Fig.1-I, 2-E). Uma característica importante notada no grupo PSI se refere a menor quantidade de adipócitos por campo (Fig.2-G) em comparação ao grupo CC na periferia e no interior dos lobos.

A composição e organização tecidual na IPLS nas amostras do MP são similares às amostras do MT (Fig.3-C e 3-D). Observa-se no grupo CC uma concentração maior de adipócitos por campo (Fig.3-E, 3-F, 3-G) na região periférica dorsal da IPLS e, entre os mesmos se encontram vasos sanguíneos e aglomerados de gânglios nervosos. Os fascículos de fibras musculares (Figura 3-H) nestes espécimes estão entremeados por adipócitos e delimitados pelo TCF e TCMD. No grupo PSI observou-se uma menor concentração de adipócitos no interior (Fig.4-C), entre os fascículos de fibras musculares (Fig.4-D) e na periferia (Fig.4-E) do LS em relação ao grupo CC. Notou-se uma maior concentração de fascículos de fibras musculares no interior do LS delimitando o TCMD e TCF (Fig.4-F e 4-G) e bem como, nas áreas periféricas do LS (Fig.4-H) do grupo PSI.

DISCUSSÃO

O critério de seleção utilizado neste estudo foi a partir da avaliação US, macroscópica e histológica de espécimes retirados da IPLS de MT e MP da raça CC, comparados a espécimes da raça PSI. Somente foram obtidos dados referentes à idade dos animais e a raça. Os animais selecionados para o estudo não apresentaram histórico prévio de claudicações relacionadas à IPLS dos MT e MP. Os espécimes selecionados não apresentaram alterações US compatíveis a alterações da IPLS quando comparados ao membro contralateral. A escolha da técnica US como seleção das amostras se deve ao fato desta representar a modalidade mais frequentemente utilizada na rotina clínica para avaliação de tecidos moles. Segundo Carnicer et al. (2012), a ultrassonografia é a modalidade de diagnóstico por imagem mais utilizada na avaliação do aparelho suspensório, mas a interpretação das imagens obtidas da IPLS pode variar devido à ecogenicidade do mesmo. Isso pode ser ocasionado devido a artefatos produzidos pela composição histológica única do LS (Budras et al. 2003). Importante considerar que existem diferenças individuais no que se refere à quantidade de fibras musculares na IPLS provocando uma variação na ecogenicidade ultrassonográfica (Zauscher et al. 2013). Na correlação entre espécimes do grupo CC e do grupo PSI não houve diferença entre a quantidade de fibras musculares entre os dois grupos ($p = 0,2187$). No entanto, uma característica histológica importante é que, os fascículos de fibras musculares não estavam presentes na periferia do LS e sim no centro dos fascículos de TCMD, muitas vezes delimitados pelo mesmo ou por TCF e tecido adiposo.

O diagnóstico US é utilizado para diferenciar alterações na ecogenicidade e bem como, as irregularidades no contorno do LS (Imboden et al. 2009). Resultados realizados por Reeding & Scharamme (2007) demonstraram que a especificidade ultrassonográfica é baixa quando comparada a técnica de ressonância magnética na documentação de lesões relacionadas a claudicações originadas na região plantar do MTIII. Em contrapartida, Denoix et al. (2008) descreve a técnica US como a modalidade no diagnóstico por imagem mais utilizada na avaliação de alterações do LS.

As fibras musculares possuem ecogenicidade menor que as fibras ligamentares, criando uma variação no padrão de ecos na IPLS normal (Agut et al. 2009). Esta variação foi observada em espécimes do grupo CC e PSI em nosso estudo, criando em algumas avaliações, pontos ou linhas hipocogênicas delimitadas no interior do ligamento suspensório. Ultrassonograficamente as fibras musculares possuem ecogenicidade menor em comparação as fibras ligamentares em decorrência de sua arquitetura tecidual, criando desta forma, uma variação no padrão de ecos produzidos. No entanto se observou, que o tecido adiposo é hiperecogênico quando o membro está em flexão, porém quando o membro encontra-se em apoio bipodal possui menor ecogenicidade em relação às fibras ligamentares. Concordando com Dyson (1998), a quantidade variável de fibras musculares na IPLS poderia contribuir para a produção de áreas

hipoecogênicas nas imagens ecográficas e, desta forma dificultando a realização de uma avaliação ultrassonográfica precisa da arquitetura ligamentar na IPLS. A ecogenicidade das fibras musculares é menor em relação as fibras colágenas do LS. Em contraste, a ecogenicidade do tecido adiposo não é ângulo negativo dependente. O tecido adiposo é hiperecogênico e também pode aparecer com ecogenicidade similar às das fibras colágenas do LS (Bischofberger et al. 2006). Segundo Micklethwaite et al. (2001), o exame US deve ser realizado com os equinos apoiando os membros no solo, porque realizando o mesmo sem a tensão do peso nos ligamentos e tendões pode ocorrer uma redução da ecogenicidade que produz artefatos, podendo ser confundidos com lesões. Em nosso estudo observamos que quando o membro se encontra em extensão completa, situação simulada pela prensa onde os membros foram colocados, o tecido adiposo é hipoecogênico. No entanto, quando não alcançamos um apoio com extensão plena, similar à biomecânica do animal, o tecido adiposo passa a ser hiperecogênico. Este dado foi comprovado quando, o membro em extensão completa se observava uma linha hipoecogênica espessa bem demarcada que se encontra em íntimo contato com a superfície de MCIII e a sua entese entre o MCII e MCIV acompanhando a área de bifurcação do LS no MT e, tornava-se hiperecogênica quando o mesmo se encontrava em leve flexão. Na avaliação macroscópica correspondeu a um tecido adiposo espesso de coloração amarelada presente na periferia dorsal da IPLS, preenchendo o espaço formado pela sua lobulação. A avaliação histológica morfológica demonstrou ($p = 0,0038$), a presença de uma grande quantidade de adipócitos intercalados por vasos sanguíneos e numerosos gânglios nervosos na raça CC. Os adipócitos também estavam presentes em menor número entre as fibras musculares, o TCF e o TCMD da IPLS. Esta composição foi observada em 96% das amostras do grupo CC, sendo que somente uma amostra (4%) não apresentou esta característica. Em contraste, no grupo PSI estes achados não foram observados. Na avaliação macroscópica a organização do tecido adiposo como descrito anteriormente não se apresentou da mesma forma, neste grupo em algumas amostras havia uma fina camada presente no aspecto que está em íntimo contato com a brida carpiana. Este achado foi compatível com a avaliação histológica e também se observaram adipócitos presentes entre os fascículos de fibras musculares, o TCF e o TCMD. Conforme descrito Werpy et al. (2013), embora as regiões com presença de tecido adiposo e de fibras musculares estejam frequentemente localizadas no interior dos lobos, as mesmas podem ser observadas em seções histológicas dissecando as fibras colágenas do LS e estarem localizadas na periferia. No entanto, muitas vezes o tecido adiposo e as fibras musculares são intercaladas no interior do LS contribuindo assim para uma variação na sua ecogenicidade (Scharamme et al. 2012).

A IPLS no MT possui uma aparência bilobada e geralmente o lobo medial é mais fino e mais largo que o lobo lateral (Werpy et al. 2013). No grupo PSI foi observado macroscopicamente que o lobo medial é mais largo e mais achatado e o lobo lateral mais arredondado e proeminente. Este achado macroscópico não foi visualizado no grupo CC não havendo diferenças de forma e tamanho entre os lobos. No MP o formato triangular do LS é mais fino medialmente do que lateralmente e, está próximo do MTIV e se separa do MTII devido a uma maior quantidade de tecido conjuntivo (Werpy et al. 2013). Este achado foi observado macroscopicamente em ambos os grupos com a diferença que no grupo CC se encontra uma espessa camada de tecido adiposo periférico e que na maioria das amostras invadem o interior do LS. Em cavalos da raça Standardbred foi observado uma maior quantidade de fibras musculares no LS nos MT que nos MP e que esta relação é inversa na raça PSI (Soffler et al. 2006). Esta diferença não foi observada no grupo CC e no grupo PSI.

A IPLS no MT e no MP possui uma organização tecidual em fascículos muito similar a observada em tendões. O TCMD está delimitado pelo TCF e intercalado por fibras musculares e adipócitos. Histologicamente, como descrito por Scharamme et al. (2012), o LS é composto por espaços interfasciculares contendo TCMD e suas fibras colágenas.

A relação dos achados US, macroscópicos e histológicos da IPLS de MT e MP de CC, e também correlacionados aos achados do grupo PSI, permitem uma acurácia elevada na interpretação US, proporcionando informações sobre a morfologia e a organização tecidual do LS da raça CC. Os resultados possibilitam um melhor entendimento como, por exemplo, das imagens ultrassonográficas que não correspondem a lesões da IPLS, enfatizando a necessidade de um maior conhecimento sobre o comportamento das alterações US e seus possíveis erros.

CONCLUSÃO

A IPLS em CC possui características individuais em relação a sua forma, tamanho, composição tecidual e, conseqüentemente, sujeito a variações de ecogenicidade. Estes achados são de fundamental importância para a realização da interpretação ultrassonográfica.

Agradecimentos. - Clínica Hípica (Dr. Jarbas Castro Jr – *in memoriam*)

REFERÊNCIAS

- Agut A., Martinez M.L., Sánchez-Valverde M.A., Soler M. & Rodríguez M.J. 2009. Ultrasonographic characteristics (cross-sectional area and relative echogenicity) of the digital flexor tendons and ligaments of the metacarpal region in Purebred Spanish horses. *Vet. Journal* 180(3):377-383.
- Bischofberger A.S., Konar M., Ohlerth S., Geyer H., Lang J., Ueltschi G. & Lischer C.J. 2006. Magnetic resonance imaging, ultrasonography and histology of the suspensory ligament origin: a comparative study of normal anatomy of Warmblood horses. *Equine Vet. J.* 38(6):508-516.
- Budras K.D., Sack W.O. & Röck S. 2003. Thoracic Limb, p.2-13. In: *Anatomy of the Horse*. 4th ed. Editora K.-D. Budras, W.O. Sack and S. Röck, Schlütersche, Hannover.
- Carnicer D., Coudry V. & Denoix J.M. 2012. Ultrasonographic examination of the palmar aspect of the pastern of the horse: sesamoidean ligaments. *Equine Vet. Educ.* 25:256-263.
- Denoix, J.M. 1994. Diagnostic techniques for identification and documentation of tendon and ligament injuries. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 10(2):365-407.
- Denoix J.M., Coudry V. & Jacquet S. 2008. Ultrasonographic procedure for a complete examination of the proximal third interosseus muscle (proximal suspensoryligament) in the equine fore limbs. *Equine Vet. Educ.* 3:148-153.
- Dyson, S. 1991. Proximal suspensory desmitis: Clinical, Ultrasonographic and Radiographic features. *Equine Veterinary Journal*, v.23, n.1, p.25-31.
- Dyson S. 1998. Suspensory apparatus, p.447-475. In: *Equine Diagnostic Ultrasonography*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Gibson K.T. & Steel C.M. 2002. Conditions of the suspensory ligament causing lameness in horses. *Equine Vet. Educ.* 14:39-50.
- Imboden I., Waldern N.M., Wiestner T., Lischer C.J., Ueltschi G. & Weishaupt, M.A. 2009. Short term analgesic effect of extracorporeal shock wave therapy in horses with proximal palmar metacarpal/plantar metatarsal pain. *Vet. Journal* 179:50-59.
- Micklethwaite L., Wood A.K., Sehgal C.M., Polansky M., Dowling B., Dart A., Rose R. & Hodgson D. 2001. Use of quantitative analysis of sonographic brightness for detection of early healing of tendon injury in horses. *Am. J. Vet. Res.* 62:1320-1327.
- O'Neil J.M.D. 2008. *Musculoskeletal ultrasound: anatomy and technique*. Springer, New York.
- Reeding W.R. & Schramme M.C. 2007. The use of MRI in the diagnosis of proximal plantar metatarsal pain in 22 horses. In: *Proceedings of the 16th annual scientific meeting of the European College of Veterinary Surgeons*, Dublin, Ireland, p.170-174.
- Schulze T. 2007. *Magnetresonanztomographische, computertomographische und histologische Untersuchung zum M. interosseus medius der Beckengliedmaße des Pferdes*. Vet. Med. Diss. Berlin.
- Schramme M., Jossion, A. & Linder K. 2012. Characterization of the origin and body of the normal equine rear suspensory ligament using ultrasonography, magnetic resonance imaging, and histology. *Vet Radiol. Ultrasound* 53:318-328.
- Schulze T. & Budras K.D. 2008. Zur klinisch-funktionellen Anatomie de M.interosseus medius der Hintergliedmaße im Hinblick auf die Insertionsdesmopathie des Pferdes – Kernspin-, computertomographische- und morphologische Untersuchungen. *Pferdeheilkunde* 3:343-350.
- Soffler C. & Hermanson J. W. 2006. Muscular Design in the Equine Interosseus. *Muscle. J. Morphol.* 267:696-704.
- Zauscher J.M., Estrada R., Edinger J. & Lischer C.J. 2013. The proximal aspect of the suspensory ligament in the horse: How precise are ultrasonographic measurements? *Equine Vet. J.* 45:164-169.
- Werpy N.M., Denoix J.M., McIlwraith C.W. & Frisbie D.D. 2013. Comparison between standard ultrasonography, angle contrast ultrasonography, and magnetic resonance imaging characteristics of the normal equine suspensory ligament. *Vet. Radiol. Ultrasound* 54(5):536-547.

Legenda das figuras

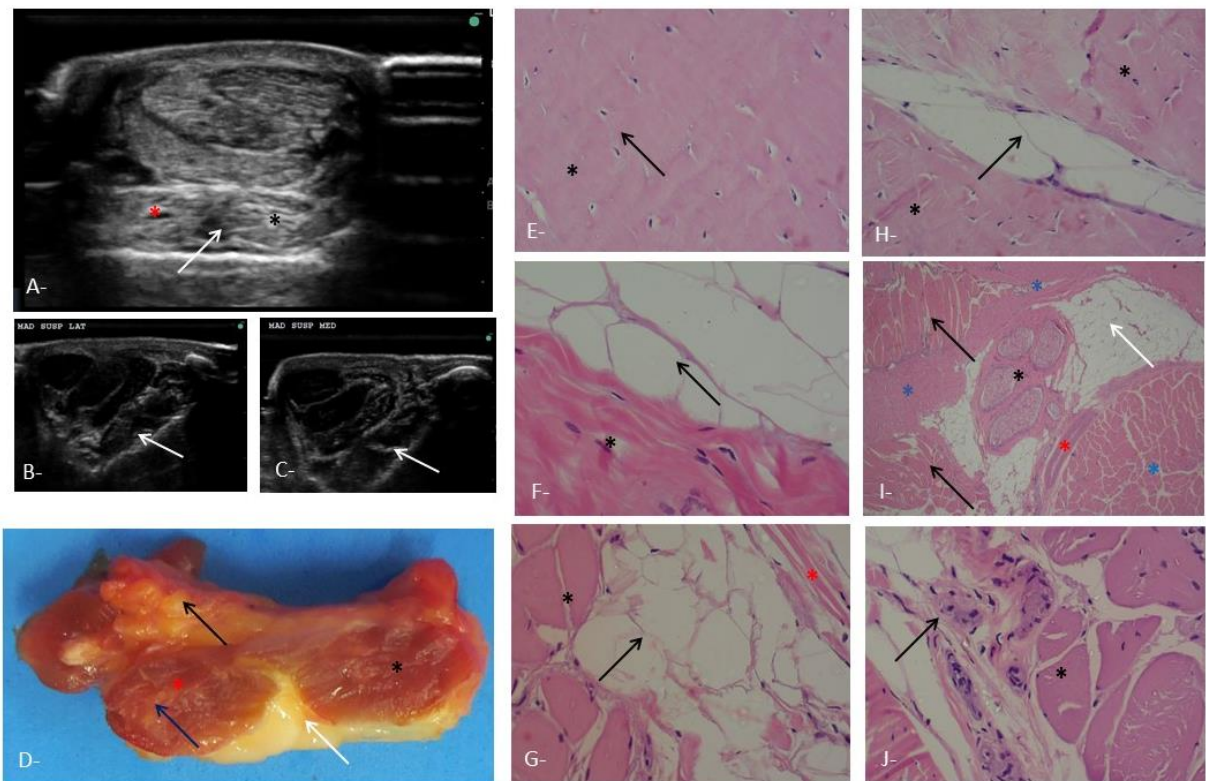


Fig.1. IPLS do MT da raça Crioula (A) Secção transversal proximopalmar US - Medial [esquerda] e Lateral [direita] hipocogenidade da região periférica que acompanha o ponto onde ocorre a lobulação (seta). Os lobos são ecogênicos, entremeados por alguns pontos hipocogênicos [asterisco vermelho lobo medial e asterisco preto lobo lateral]. (B) e (C) Secção US transversal proximolateral (B) e proximomedial (C). Medial [esquerda] e lateral [direita], notam-se algumas linhas e pontos hiperecogênicos em toda a sua periferia e, alcançando o interior do lobo [setas]. As mesmas, não são ângulo-negativo dependente. (D) Secção transversal macroscópica- Lobo medial [asterisco vermelho] lobo lateral [asterisco preto]. Tecido adiposo na perifeira dorsal [seta branca], no interior do ligamento [seta azul] e em contato com a brida carpiana [seta preta]. (E) H&E [200x]- IPLS composta por TCMD [asterisco] e fibras colágenas [seta]. (F) H&E [200x] - nota-se os adipócitos na região periférica dorsal [seta] delimitando o TCF [asterisco]. (G) H&E [200x]- adipócitos [seta preta] intercalados por fibras musculares [asterisco preto] e por TCF [asterisco vermelho]. (H) H&E [200x] - adipócitos [seta] entre o TCMD [asterisco]. (I) H&E [100x]- IPLS- Observam-se núcleos de gânglios nervosos [asterisco preto] entre adipócitos (seta branca) e delimitados pelo TCF [asterisco vermelho] pelo TCMD [asterisco azul] e pelos feixes de fibras musculares [seta preta]. (J) H&E [200x]- Observam-se vasos sanguíneos [seta] entre os fascículos de fibras musculares [asterisco].

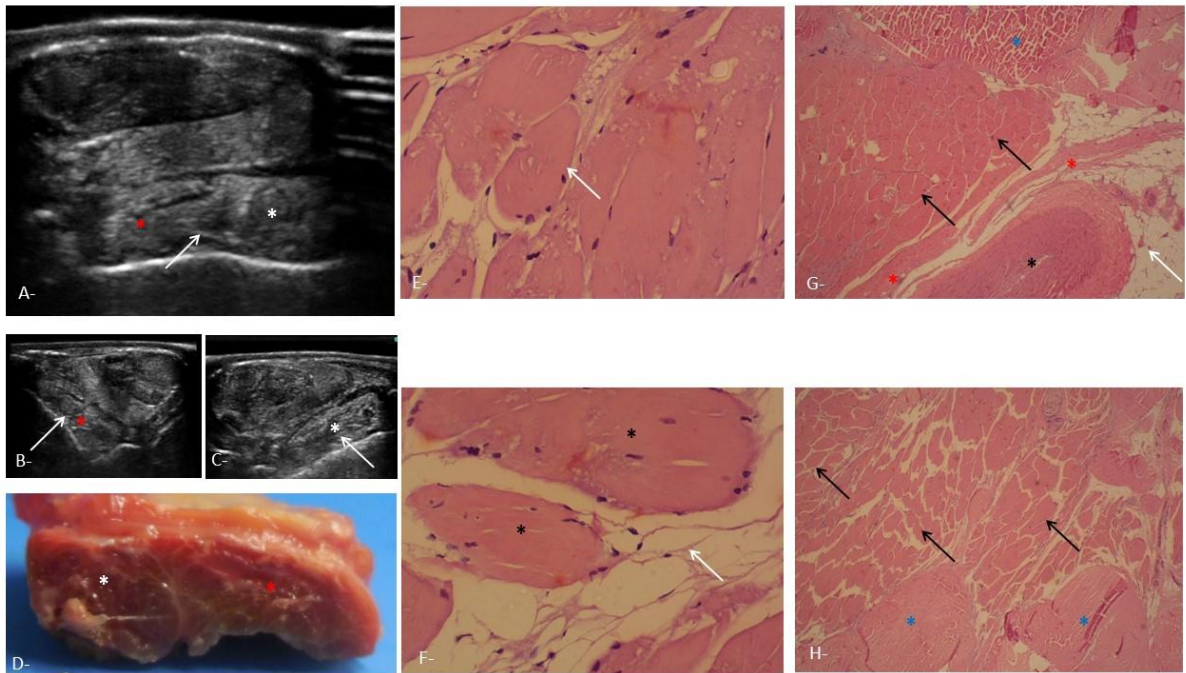


Fig.2. IPLS do MT da raça PSI (A) Secção US transversal proximopalmar - Medial a esquerda e lateral a direita. A região periférica dorsal, lobulada que entra em contato direto com o MCIII [seta]. Os lobos medial [asterisco vermelho] e lateral [asterisco branco] são ecogênicos, intercalados com áreas hipoeogênicas em maior intensidade. Se observa diferença de tamanho e forma entre ambos. (B) e (C) Secção US transversal proximomedial (B) e proxilateral (C). Medial [esquerda] e Lateral [direita] - Se observa a diferença de tamanho e forma entre o lobo medial [asterisco vermelho] e lateral [asterisco branco]. Pontos hiperecogênicos sutis localizados na periferia dorsal em contato com o MCIII [seta]. (D) Secção transversal macroscópica - Se observa o lobo lateral é mais arredondado e proeminente [asterisco branco] em comparação ao lobo medial que se encontra mais achatado e fino [asterisco vermelho]. (E) H&E - arranjo dos fascículos de fibras musculares [seta]. Objetiva 20x. (F) H&E - As fibras musculares [asterisco] delimitadas por uma pequena quantidade de adipócitos [seta]. Objetiva 20x. (G) H&E- Menor quantidade de adipócitos [seta branca] entre o TCF [asterisco vermelho], TCMD [asterisco azul], fascículos de fibras musculares [seta preta] e vaso sanguíneo [asterisco preto]. Objetiva 10x. (H) H&E - Se observa o TCMD [asterisco azul] delimitado por uma grande quantidade de fascículos de fibras musculares [seta preta]. Objetiva 10x.

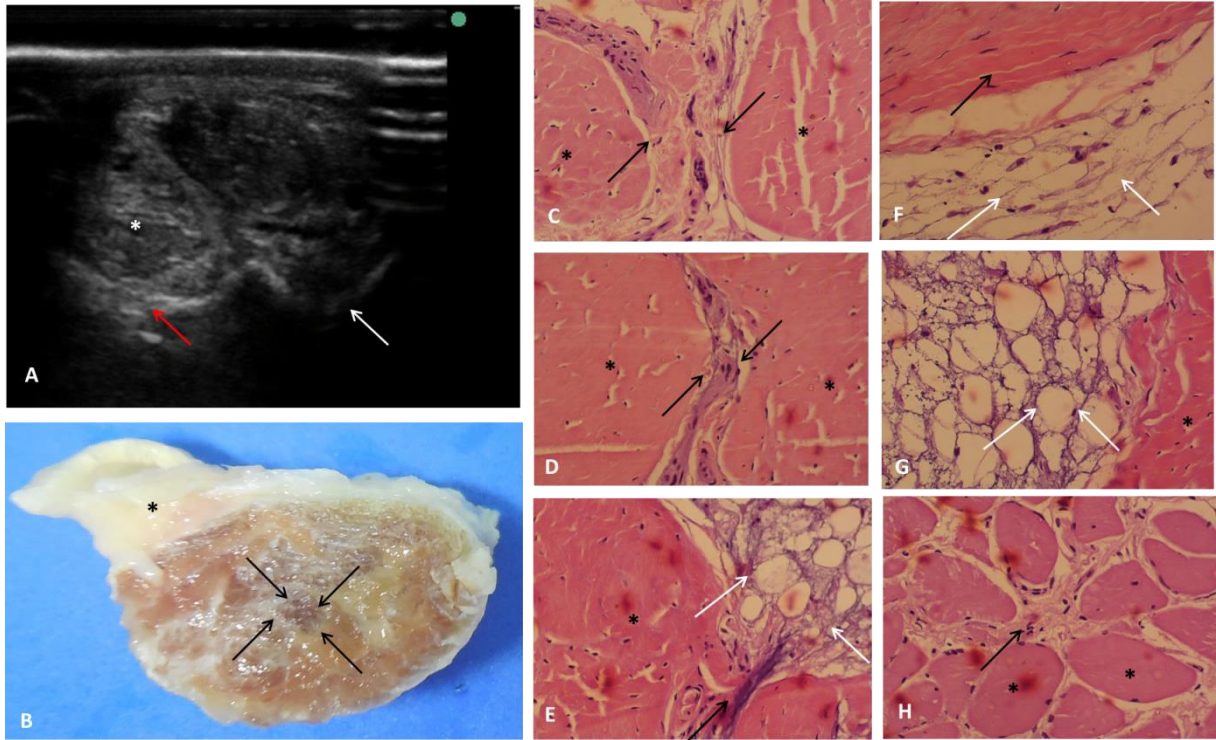


Fig.3. IPLS do MP da raça Crioula (A) Secção US transversal plantaromedial. Medial a esquerda e lateral a direita - Se observa um formato arredondado do LS [asterisco] disposto sob a superfície óssea do MTIII [seta branca] e a entese do MTII [seta vermelha], ecogênico intercalado por pontos hipocogênicos. (B) Secção transversal macroscópica- Se observa o formato arredondado do LS e a sua organização em fascículos [seta preta] delimitado por um tecido branco perolado [asterisco]. (C) e (D) H&E - Observe os fascículos de TCMD [asterisco] delimitados pelo TCF [seta]. Objetiva 20x. (E), (F) e (G) - H&E - Disposição dos adipócitos [seta branca] entre o TCMD [asterisco] e o TCF [seta preta]. Objetiva 20x. (H) H&E- Se observam fascículos de fibras musculares [asterisco] entre o TCF [seta]. Objetiva 20x.

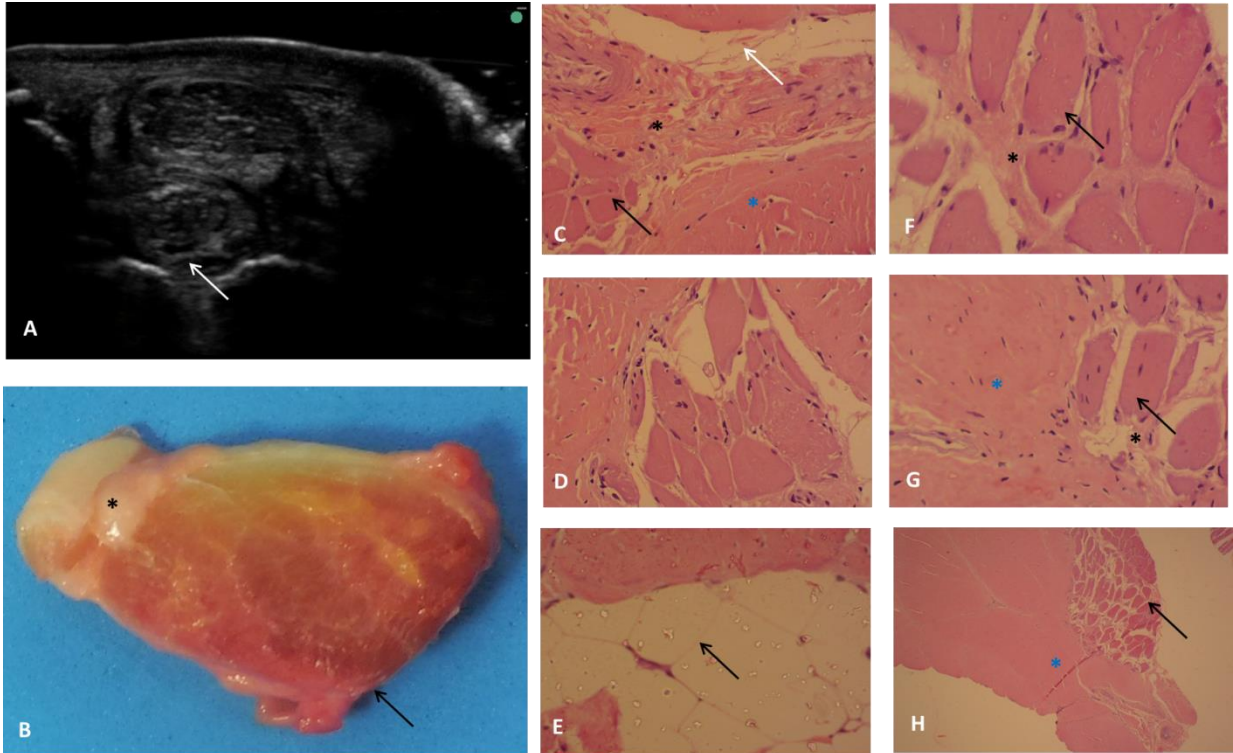


Fig.4. IPLS do MP da raça PSI. (A) Secção US transversal plantaromedial da IPLS do MP na raça PSI - Se observa a periferia dorsal do LS ecogênica [seta]. (B) Secção transversal macroscópica da IPLS - Nota-se um tecido branco perolado que circunda o LS [asterisco] e o seu formato triangular de coloração vermelho- claro [seta]. (C) e (D) H&E- Se observou uma menor concentração de adipócitos no interior do LS entre o TCF [asterisco preto], TCMD [asterisco azul] e fascículos de fibras musculares [seta preta]. Objetiva 20x. (E) H&E - Se observa pequena quantidade de adipócitos no interior do LS. Objetiva 20x. (F) e (G) H&E - Arranjo dos fascículos de fibras musculares [seta] entre o TCF [asterisco preto] e o TCMD [asterisco azul]. Objetiva 20x. (H) H&E - Se observa a periferia dorsal do LS com fascículos de fibras musculares [seta] e o TCMD. Não se observam adipócitos. Objetiva 10x.

Lista de quadros

Quadro 1 – Comparação da constituição da inserção proximal do ligamento suspensório de cavalos crioulos e grupo controle (PSI, puro sangue inglês) quanto ao tecido conjuntivo modelar denso (TCMD), tecido conjuntivo frouxo (TCF), gordura e fibras musculares

Variável	Tratamentos		Valor de p^*
	Controle (PSI)	Crioulo	
TCMD	4,49 (0,05)	4,55 (0,03)	0,2953
TCF	3,08 (0,06)	3,03 (0,04)	0,4717
Tecido adiposo	3,67 (0,09)	3,99 (0,05)	0,0038
Fibras musculares	3,88 (0,14)	3,67 (0,09)	0,2187

* Valores de p maiores que 0,05, não diferem pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.
Valores entre parênteses = erro padrão da média.

6 ARTIGO 4

Trabalho a ser submetido para publicação:

Histochemistry of equine damaged tendons, ligaments and articular cartilage

Grasiela De Bastiani, Flavio De La Côte, Karin Erica Brass, Glauca Denise Kommers,
Camila Cantarelli, Stéfano Dau e Marcos da Silva Azevedo

JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY, 2017

HISTOCHEMISTRY OF EQUINE DAMAGED TENDONS, LIGAMENTS AND ARTICULAR CARTILAGE

DE BASTIANI, G. ; DE LA CÔRTE, FD ; BRASS, K.E. ; KOMMERS, G.D. ; SILVA, T.M. ; CANTARELLI, C. ; DAU, S. ; AZEVEDO, M.S.

ABSTRACT

The injury repair process in tendons and ligaments includes different phases such as inflammation, neovascularization, fibroblast proliferation and fibrosis. Collagen type and tissue characteristics of tendon and ligament repair are described. The articular cartilage repair does not occur after the injury, when characterized by loss of the articular cartilage layers such as fibrillation and eburnation. Tissue samples of equine tendons, ligaments and articular cartilage of the metacarpophalangeal joint region were evaluated by ultrasonography, macroscopically and prepared for routine histopathology (hematoxylin-eosin [H&E] staining). The Masson's trichrome, Pricosirius red and Alcian blue staining techniques were also performed in addition to H&E. Pathologic findings in the tendons and ligaments included fibroplasia, collagenolysis, chondroid metaplasia and lymphohistioplasmacytic inflammation. Tendons and ligaments scars were composed of type III collagen but there was also some type I collagen. Fiber alignment of tendons and ligaments in the reorganization tissue was not flawless and the fiber appearance was characterized by a lack of the fiber crimp and parallelism. The combined histochemistry staining technics allowed an improved characterization of fiber alignment, collagen type, inflammatory cell infiltration and neovascularization, which happens during the repair process of tendons and ligaments. The fibrillation and eburnation of the articular cartilage were associated with the decrease Alcian Blue staining.

Key Words- tendons, ligaments, articular cartilage, histochemistry

INTRODUCTION

Mechanical stress capable of altering the blood supply of tendons and ligaments has been considered the primary cause of injuries (WEBBON, 1977), damaging the microvasculature as consequence of tendon overuse (KANNUS, 1997). Therefore, soft tissue lesions are important for performance horses if only considers that approximately 300.00 thousand tendons and ligaments repair surgeries are performed annually in the United States (PENNISI, 2002). Tendon damage is also a common injury in racing Thoroughbreds and other competition horses and with many other species, leading to the formation of biomechanically weaker scar tissue and, therefore, resulting in a high probability of re-injury (DYSON, 2004).

Fascicles of collagen are arranged in a waveform called crimp, and are responsible for promoting impact absorption that the tissue undergoes. Different types of collagen have different functions in the tendons and ligaments tissues. The type I, II and III collagen fibers are responsible for maintaining the tissue architecture and rigidity (SATOMI et al., 2008). Tendon matrix is composed predominantly of type I collagen, with a small percentage of other collagens and non-collagens proteins, such as proteoglycans (KASTELIC et al., 1978). Many stain techniques have been developed for the collagen fibers study, the most of which is the Masson's trichrome stain but, this stain cannot differentiate the type of collagen fibers (MONTES, 1996).

The articular cartilage is characterized by a flexible connective tissue composed primarily of water (68-85% of the weight), fibrillar matrix containing type II collagen (10-20%), proteoglycans (5-10%) and chondrocytes (MOW & RATCLIFFE, 1997).

The repair process of tendons and ligaments includes different phases such as inflammation, neovascularization, proliferation of granulation tissue and fibrosis. However, the articular cartilage repair does not occur after the injury, and is characterized by loss of the articular cartilage layers, such as fibrillation and eburnation. The aim of this study is to describe by histochemistry techniques the characteristics of tissue scar, collagen type in the repair process of tendons and ligaments, as well as articular cartilage degeneration.

MATERIALS AND METHODS

Tissue obtaining and preparation for analysis

Fourteen samples of tendons, ligaments and articular cartilage of the metacarpophalangeal joint of the forelimb equine specimens, were evaluated macroscopically. These samples were part of previous ultrasound and macroscopic study (DE BASTIANI et al., 2014). Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin solution for 14 days. Then, they were processed routinely for histopathology. The samples were then cut into 3µm histological sections and stained by hematoxylin and eosin (H&E) method. The Masson's trichrome (MT), Picrosirius red (PR) and Alcian blue (AB) staining techniques were also performed. The MT (EasyPath Kit, São Paulo, Brazil) allows the collagen differentiation between the loose and the dense tissue in tendons and ligaments. The loose connective tissue stains in blue and the dense connective tissue stains in red. The PR (EasyPath Kit, São Paulo, Brazil) was used for the differentiation of type I and III collagen fibers in tendons and ligaments, under polarized light. In PR stain, collagen type I fibers were orange and thick, differing from the collagen fibers type III, that were greenish to blue and thin. The articular cartilage sections (and the subchondral bone tissue), after fixation, underwent a decalcification process (with aqueous solution of sodium citrate and formic acid). The samples were then processed routinely for histopathology. The AB technique (pH 2,5) for identification of hyaline cartilage was modified from Culling et al., (1985) counterstained with H&E. The AB stain demonstrated the presence of a myxoid-like matrix in fibroblastic tissue of tendons and ligaments, that was AB-positive matrix. In samples of the articular cartilages, the AB stain demonstrated the hyaline chondroid matrix.

Inclusion criterion of the samples

The inclusion criterion of the samples in this study was based on the presence of lesions characterized in H&E stain as fibroplasia, neovascularization, collagenolysis, chondroid metaplasia in tendons and ligaments and fibrillation and cartilaginous eburnation lesions in articular cartilage samples. Findings were divided according to the type of lesion observed in H&E study, divided into categories such as junction of Superficial Digital Flexor Tendon (SDFT) and Manica Flexoria (MF) (2), SDFT (1), Deep Digital Flexor Tendon (DDFT) (5), Palmar Annular Ligament (PAL) (2) of metacarpophalangeal joint palmar region, Suspensory

Ligament (SL) lateral branch (1), and Articular Cartilage (AC) of metacarpus III (MCII) condyle, (3).

RESULTS

Deep Digital Flexor Tendon (DDFT)

Gross lesions of the DDFT in the cross section were characterized by hemorrhagic infiltration and red to dark-yellow zones and, in one sample, the consistency of the tendon was very soft.

The H&E findings of the deep digital flexor tendon tissue of the palmar aspect of the metacarpophalangeal joint were divided into: fibroplasia (Figure 1-A), collagenolysis, neovascularization and chondroid metaplasia.

The compact alignment of the collagen fibers and the dense connective tissue possibly make the penetration of the MT stained difficult and reproduce the red color stain. In contrast, the loose connective tissue presented blue tinctorial property and the penetration of the TM stain was easy by done.

In the MT-stained samples, fibroplasia (Figure 1-C) in the DDFT was characterized by endotendinous thickening areas with the presence of generous amount of loose connective tissue. In these areas, the dense connective tissue was replaced by the loose connective tissue. These same regions in AB (Figure 1-B) staining presented as a myxoid-lyke matrix. In the PR-stained samples, the dense connective tissue corresponded of thick orange collagen fibers (type-I collagen fibers) (Figure 1-C). The loose connective tissue is composed by type-III collagen fibers, represented as greenish-collagenous fibers. In the areas of loose connective tissue substitution, collagen type fibers are intercalated to a lesser extent by type-III collagen fibers. In longitudinal histological sections the type-I collagen fibers lose their linear arrangement. The disorganization of the tissue is well evidenced.

Chondroid metaplasia of the tendinous tissue in the MT-stained demonstrated a perfect formation of chondrocytes submerged in the abundant loose connective tissue stained in blue. The same areas in AB-stained samples formed a myxoid-lyke matrix, characterized by positive interlaced AB-positive tissue bundles interspersed by chondrocytes. In PR-stained samples the polarization was restricted, tissue disorganization was composed of loose

connective tissue and some type-III collagen fibers is observed intermingled of type-I collagen fibers.

Collagenolysis was associated with neovascularization and characterized by abundance of blood vessels between the loose connective tissue, which strongly stained in blue in the MT. In AB-stained samples, areas of loose connective tissue correspond to areas of neovascularized AB-positive matrix. In PR-stained samples, polarization of most fibers occurs due to the lack of linear arrangement of the fibers composed of type-I collagen fibers, which have a smaller number of type-III fibers.

Lymphohistioplasmacytic tendinitis was characterized in the MT-stained samples by abundant loose connective tissue interspersed with dense connective tissue. In AB-stained samples the presence of chondrocytes wrapped by an AB-positive matrix. In the PR-stained samples, the polarization of the loose connective tissue occurred, most of the type I collagen fibers being accompanied by a lack of fascicular arrangement.

Superficial Digital Flexor Tendon (SDFT) and junction of Manica Flexoria

Gross transversal sections of the SDFT showed lesions characterized by the presence of dark-yellow necrotic zones with soft consistency at the touch. The H&E findings corresponded to lymphohistioplasmacytic inflammation and focally extensive severe fibrosis associated with chondroid metaplasia in the epitenon region. Lymphohistioplasmacytic tendinitis was associated with necrotic, hemorrhagic and chondroid metaplasia areas, corresponding in the MT technique to a disorganized loose bluish connective tissue with numerous chondrocytes. The chondroid metaplasia was confirmed in the AB staining and was characterized by chondrocytes surrounded by an chondroid AB-positive matrix. In the PR stain, the areas composed by disorganized loose connective tissue corresponded to collagen type I fibers (orange polarized stain) intermingled with collagen type III fibers (green polarized stain). Grossly, manica flexoria in one tissue sample, at the junction of SDFT, presented pearly white tissue and in another sample there was thickened fibrous tissue, corresponding to collagenolysis (Figure 2-A) and chondroid metaplasia, respectively. The collagenolysis lesions associated with chondroid metaplasia were characterized by loose connective tissue areas with interspersed dense connective tissue in MT staining (Figure 2-C). Abundant neovascularization associated with chondrocytes was seen. The loose connective tissue areas which by AB staining corresponded to a loose matrix stained in blue (Figure 2-B).

Most type I collagen fibers polarized in PR stain associated to the presence of the dense connective tissue (Figure 2-D). In contrast, in the areas corresponded to loose connective tissue, a better polarization occurs and collagen fibers type I and III were observed in PR stained sections.

Palmar Annular Ligament (PAL)

Gross longitudinal lesions of the PAL were represented by thickened fibrous areas associated with a yellow discoloration and adhesions to the SDFT. There is multifocal fibrosis, probably in the adhesion area, with abundant neovascularization. Also, observed collagenolysis areas intermingled with chondrocytes in H&E were observed associated with a loss of collagen fibers linear arrangement, interspersed with neovascularized loose connective tissue. In the MT-stained samples, the loose connective tissue appeared strongly stained in blue, interspersed by some areas of dense connective tissue stained in red, associated to neovascularization areas. In the PR-stained samples, polarization of the majority of the collagen fibers occurred; the lack of their linear arrangement was characterized by type-I collagen (thick orange fibers), in the middle of which a smaller type-III fibers (fine green fibers) were observed.

Suspensory ligament (SL) lateral branch

Gross transversal lesions of the SL lateral branch showed white fibrous tissue located in the center of the ligament and thickening of the epitenon region, associated with severe irregularity of the abaxial aspect of the proximal lateral sesamoid bone (insertion area). These H&E-stained findings were characterized by the formation of islands of chondrocytes in the center of the fascicles associated with a thickened epitenon region. The fibrous tissue grossly corresponded to chondroid metaplasia, observed in AB-stained as the numerous chondrocytes were surrounded by highly AB-positive matrix interspersed in the ligament fibers and connective tissue.

Articular cartilage (AC) of metacarpus III condyle (MCIII)

Macroscopically, there was loss of AC of MCIII medial and lateral aspect of the condyle with exposure of the subchondral bone associated with a dark red color and clear presence of deep linear grooves on the surface. In the H&E technique, it was observed a severe cartilage fibrillation and eburnation. In the two other cases, gross findings were characterized by a light-red color with strong and soft linear grooves in the MCIII condyle. In

H&E stain, it was observed a focally severe-to-moderate fibrillation (Figure 3-C). In the AB-stained samples, the surface layer and the matrix zone of calcified cartilage were weakly stained in blue. Articular cartilage with moderate changes had a marked decrease in staining in the superficial zone and the upper portion of the middle zone (Figure 3-D). In the severe changes, the marked blue AB-stained matrix appeared only in the deep layers of the AC. The normal AC is characterized by the three chondrocyte layers with different shapes, stained in strong blue in the AB staining technique (Figure 3-A, 3-B).

DISCUSSION

Three special stains were utilized in this study along with the H&E evaluation. Collagen fibers got stained intensively in most of staining techniques used in this study, especially in MT. Furthermore, different types of collagen fibers are not distinguished by MT stain alone. In contrary, the PR stain contributed to the study of collagen-made structures due to enhancement of the existing birefringence in the collagen, due to its parallelism and tissue organization (MONTES, 1996). Elastic fibers of collagen type I are usually characterized by thick fibers, highly birefringent and yellow or red colored in PR stain. In the other hand, type-III collagen of the reticular fibers usually has the smallest fibers with low birefringence and green color (ORTEGA et al., 2003). In this study, the normal matrix tendon was composed by dense connective tissue, stained in red by MT, agreeing with McBRIDE et al. (1985) and rich in collagen type I fibers by PR staining.

The identification of chondroid metaplasia and multifocal fibrosis in the ligaments were important findings in this study, and were associated with abundant loose connective tissue, and predominantly type-III collagen fibers. According to HALPER et al., (2006) affections of the SL lateral branch contained white fibrous tissue and, this finding was observed in this study. It has been described that fibrocartilaginous tissue of ligament specimens contained a few small hyaline cartilage-like areas, which were characterized by homogeneous basophilic matrix with scattered plump chondroid cells (SMITH, 2013).

Fibroplasia in tendons are represented by increased fibroblasts cells and irregularities of the tissue organization in comparison to the normal tendon (OLIVEIRA et al., 2011). The important observation in this study was fibroplasia in tendons and ligaments, seems to be composed by abundant loose connective tissue, chondrocytes and intermingled collagen type I and III fibers associated with lack of crimps alignment of the fibers. The loose connective

tissue is a disorganized tissue and in the MT-stained samples. The characteristic blue discoloration of collagen fibers was only observed in the loose connective tissue, may be because the dye penetration becomes easier when compared to the dense connective tissue (stained in red). According to GUIMARAES DA SILVA (2008), immature collagen fibers and the endotendon stain in blue when using the MT technique. The loose connective tissue appears to be less compact and soft. In areas of dense connective tissue substitution for loose connective tissue there is a better polarization of the collagen fibers observed in the PR stain, which is due to a greater fragility of the loose connective tissue. This fibrous repair is functionally deficient, weaker than the normal tendon in many ways. According to BARSBY et al. (2014), the natural repair mechanisms triggered by tendon damage often leads to the formation of biomechanically inferior scar tissues that is prone to re-injury. The fragile structure suggested by the MT stain results (presence of the loose connective tissue) in this study perhaps make the tendons and ligaments receptive to other lesions.

Changes in the DDFT and SDFT evaluated in this study were characterized by hemorrhagic infiltration in the fascicles corresponding to necrotic zones and thickening of the epitenon. These findings corresponded to lymphohistioplasmacytic inflammatory infiltration and fibroplasia in the histologic evaluation, associated with deposition of loose connective tissue in the epitenon and lack of type-I collagen fibers parallelism intermingled with the deposition in type-III collagen fibers in reparation zones. This lymphohistioplasmacytic infiltration in tendons was previously described (CARVALHO et al., 2011). Specific tendon lesions should be considered as being result of vascular thrombosis and ischemia (BUSONI et al., 2005). Remodeling of the initial repair process of the ligaments and tendons is composed by hemorrhagic, vascular congestion and necrotic areas (BARREIRA, 2005). In human chronic Achilles tendinopathy, neovascularization was one of the features associated with extracellular matrix degeneration (PETERSEN et al., 2004; BECK et al., 2011). In this study, collagenolysis areas intermingled with chondrocytes were observed associated with a loss of collagen fibers linear arrangement in the DDFT interspersed with neovascularized loose connective tissue.

Articular cartilage damage begins with the release of cytokines that triggers the degradation cascade of collagen in the cartilaginous matrix. With the progress of collagen depletion, cartilage loses its ability to absorb impact, and continuous exercise results in constant trauma and consequently cartilage insults. Synovial changes are the result of inflammation including hyperplasia and fibrosis. Bone changes follow in these cases and are

characterized by the formation of peri-articular osteophytes, decreased joint space and sclerosis in the subchondral bone (SANTSCHI, 2008). In one study, the process of osteoarthritis was characterized microscopically by the loss of proteoglycans (reduction of metachromatic staining by Toluidine blue) caused by the enzymatic degradation of articular cartilage (mainly by aggrecanase and metalloproteinases). Later on the process, it can be seen fragmented collagen fibers. Exposure and calcification of the cartilaginous layers are also observed, with consequent eburnation of the subchondral bone surface (KIDD et al., 2001). In addition, ROCHA et al. (2016) observed poor staining in territorial and interterritorial matrix in the lateral trochlear of the femur lesions of the horses. The samples obtained from the femoral lateral trochlear presented weak marking (light blue) and there was no metachromatic in Toluidine blue staining (ROCHA et al., 2016). According to Hoemann et al. (2011), the Toluidine blue stain is usually used in the histological analysis to demonstrate the presence of glycosaminoglycans in the extracellular cartilaginous matrix, staining in light blue and dark purple (metochromasia). Toluidine blue was not performed in this study. Histologic examination in this study of AC by AB stain demonstrates the decrease of blue staining in lesions such as fibrillation of the AC, but the cause of this change was not determined.

CONCLUSION

The use of several histochemical techniques has shown that MT stain is an excellent technique to be used in tendons and ligaments, because it allowed distinguishing the presence of loose connective tissue from dense connective tissue. As fibroplasia and collagenolysis (observed in H&E sections) evidenced the weakness of the substitution of the dense for loose connective tissue, the MT and PR allowed to better identify the nature of these substitution connective tissue.

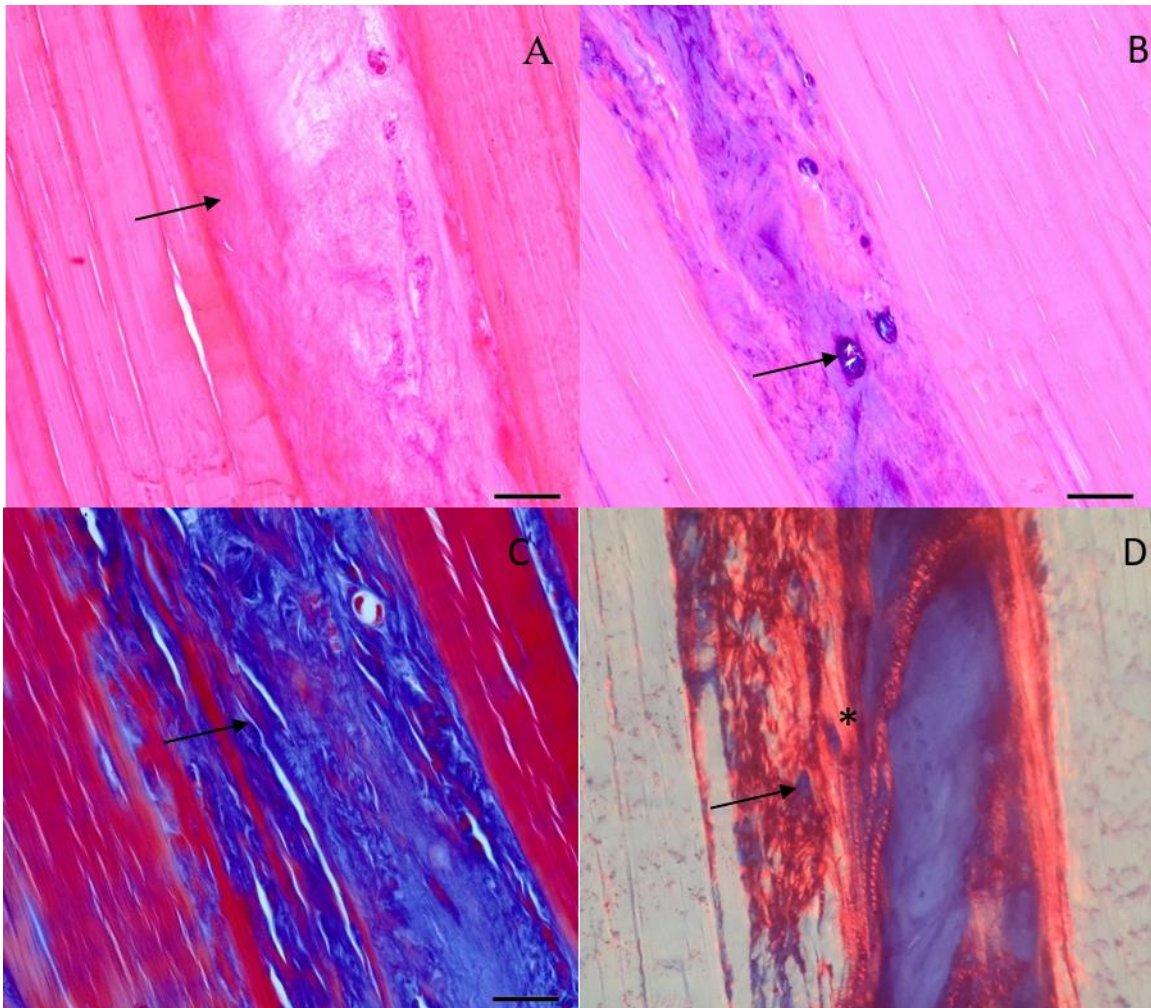
Figure 1

Figure 1 DDFT longitudinal section of the palmar aspect of the metacarpophalangeal joint - **A: H&E-** Fibroplasia and extensive multifocal cartilaginous metaplasia (arrow). Objective 10x. **B: AB** Chondrocytes enveloped by a positive Alcian Blue matrix stained in blue (arrow). Objective 10x. **C: MT-** Disorderly of loose connective tissue stained in blue (arrow). Objective 10x. **D: PR-** Collagen fibers type I in stained in orange (asterisk) intercalated by collagen fibers type III stained in dark green under polarized light (arrow). Objective 10x.

Figure 2

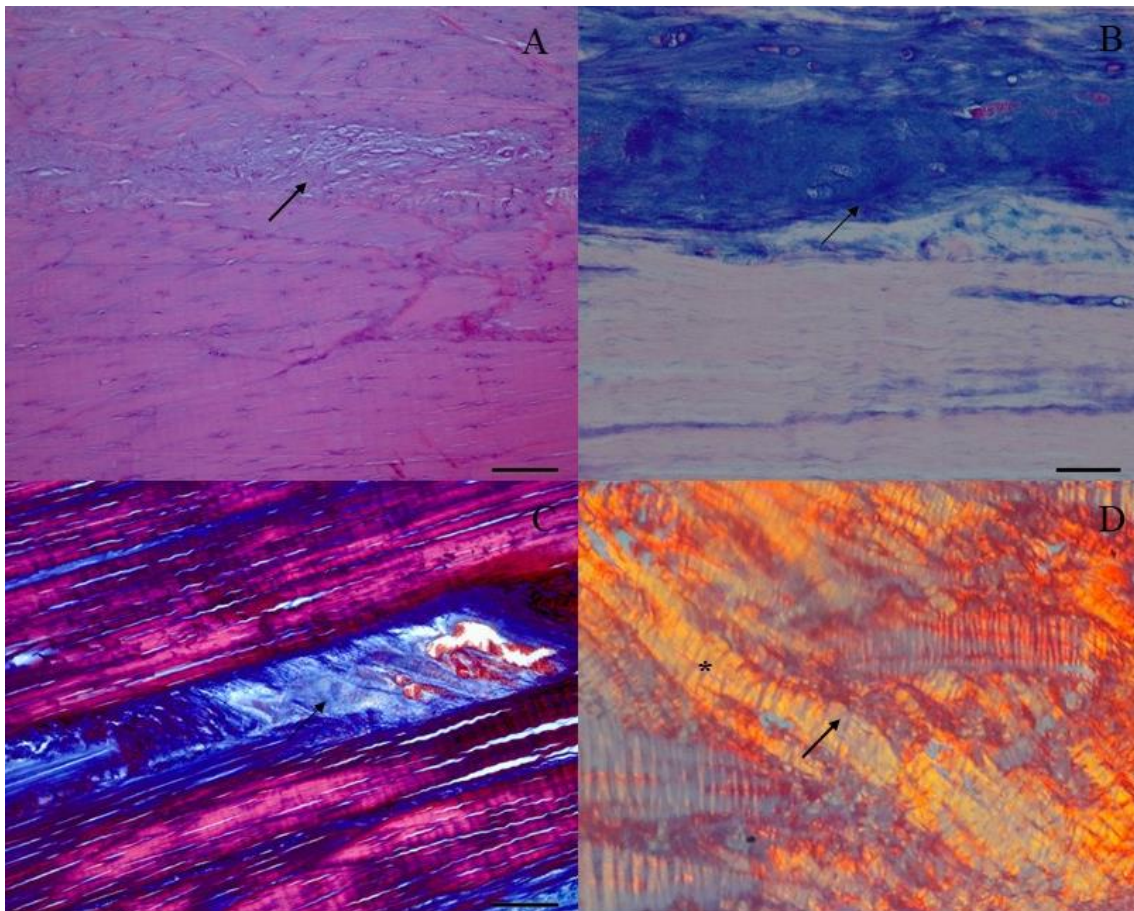


Figure 2 SDFT longitudinal section and junction of Manica Flexoria of the palmar aspect of the metacarpophalangeal joint and junction. A: H&E- Collagenolysis (arrow). Objective 10x. B: AB- Positive Alcian Blue matrix and presence chondrocytes (arrow). Objective 20x. C: MT- Disorderly of loose connective tissue stained in blue (arrow). Objective 10x. D: PR- Loss of linear arrangement of orange type I collagen fibers (arrow) interspersed with dark green type III collagen fibers under polarized light (asterisk). Objective 10x.

Figure 3

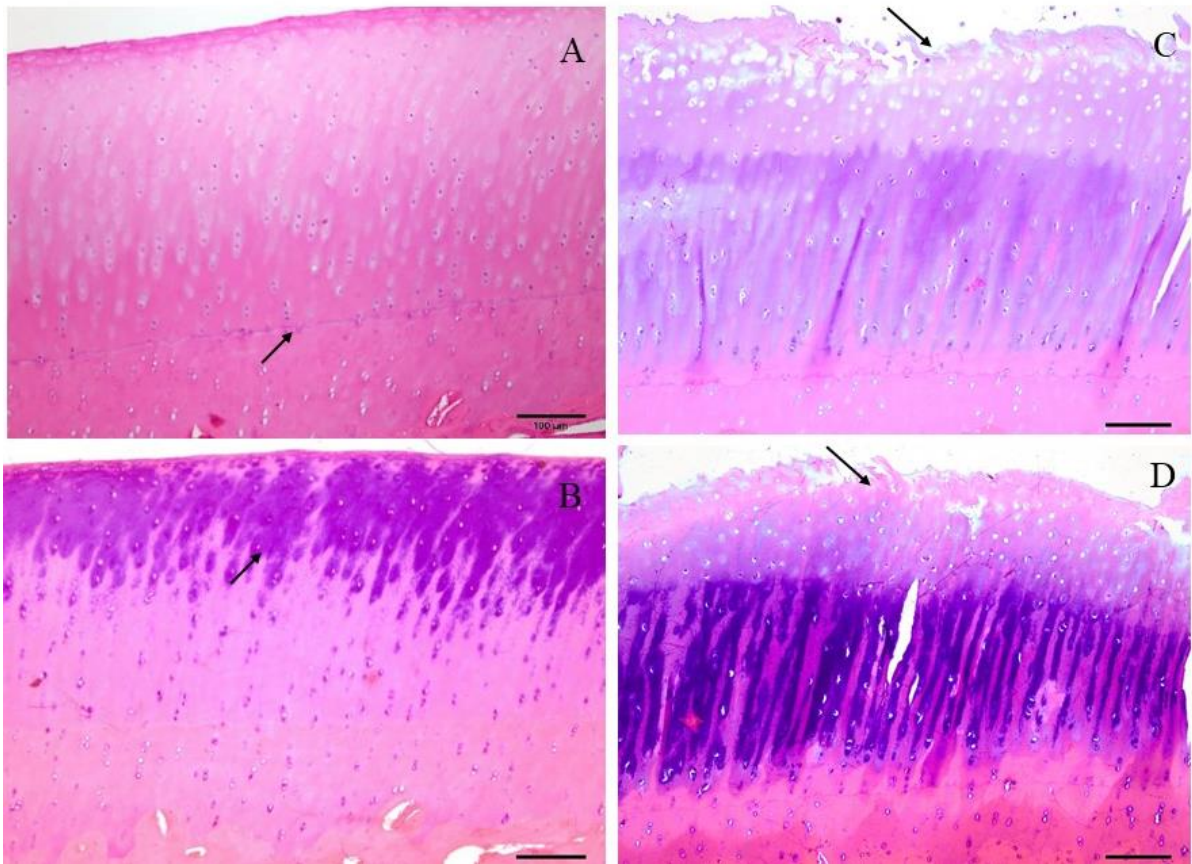


Figure 3 Articular Cartilage longitudinal section of the MCIII condyle. A: H&E- Normal articular cartilage (arrow). Objective 10x. **B: AB –** Normal articular cartilage. Stained blue (arrow). Objective 10x. **C: H&E-** Fibrillation of the articular cartilage (arrow). Objective. **D: AB-** decrease of blue stained in fibrillation of articular cartilage (arrow). Objective 10x.

REFERENCES

- BARSBY, T. et al. Three Dimensional Culture and Transforming Growth Factor beta 3 Synergistically Promote Tenogenic Differentiation of Equine Embryo-Derived Stem Cells. **Tissue Engineering**, v.1, n.20, p.2604-2613, october, 2014.
- BARREIRA, A.P.B. Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunoistoquímica [thesis]. Botucatu, SP: Paulist State University “Júlio Mesquita Filho”; 2005.
- BECK. S. et al. Are matrix and vascular changes involved in the pathogenesis of deep digital flexor tendon injury in the horse? **Veterinary Journal**, v.189, n.3, p.289–295, august, 2011.
- BUSONI, V. et al. Magnetic resonance imaging findings in the equine deep digital flexor tendon and distal sesamoid bone in advanced navicular disease – an ex vivo study. **Veterinary Radiology Ultrasound**, v.46, n.4, p.279-286, 2005.
- CARVALHO, A.M. et al. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.31, n.1, p.26-34, january, 2011.
- CULLING, C.F.A., ALLISON, R.T., BARS, W.T. **Cellular pathology technique**. 4 ed London: Butterworths, 1985, p.232.
- DE BASTIANI, G. et al. Association of ultrasound and anatomopathologic findings of equine metacarpophalangeal lesions. **Journal Equine Veterinary Science**, v.34, n.10, p.1218-1225, october, 2014.
- DYSON, S.J. Medical Management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). **Equine Veterinary Journal**, v.36, n.5, p.415-419, july 2004.
- GUIMARÃES DA SILVA, R.M. Estudo morfométrico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico do ligamento cruzado cranial com ruptura em cães. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina e Veterinária USP, 2008. Doi- 10.11606/T.10.2007.tde-27062008-113219.
- HALPER, J. et al. Degenerative suspensory desmitis as a systemic disorder characterized by proteoglycan accumulation. **BMC Veterinary Research**, v.2, n.12, p.1-14, april, 2006.
- HAYASHI, K. et al. Cranial cruciate ligament pathophysiology in dogs with cruciate disease: a review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.40, n.5, p.385-390, september – october, 2004.
- HOEMANN, C. et al. International cartilage repair society (ICRS) recommend guidelines for histological end-points for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. **Cartilage**, v.2, n.2, p.153-172, april, 2011.

KANNUS P. Etiology and pathophysiology of chronic tendon disorders in sports. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v.7, n.2, p.78–85, april, 1977.

KASTELIC, J. et al. The multicomposite structure of the tendon. **Connective Tissue Research**, v.6, n.1, p.11-23, 1978.

KIDD, J. A.; FULLER, C.; BARR, A. R. S. Osteoarthritis in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.13, n.3, p.160-168, june, 2001.

LIU, C.F. et al. What We Should Know Before Using Tissue Engineering Techniques to Repair Injured Tendons: A Developmental Biology Perspective. **Tissue Engineering Part B-Reviews**, v.17, n.3, p.165–176, june, 2011.

McBRIDE, D.J. et al. Morphological characterization of tendon development during chick embryogenesis: measurement of birefringence retardation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.7, p.71-76, april, 1985.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v.20, n.1, p.15-27, january, 1996.

MOW, V. C.; RATCLIFFE, A. Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: MOW, V.C., HAYES, W.C. **Basic Orthopaedic Biomechanics**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.514.

OLIVEIRA, P.G.G. et al. Uso de células mononucleares da medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1391-1398, 2011.

ORTEGA, H.H. et al. Morphological characteristics of the interpubic joint (*Symphysis pubica*) of rats, guinea pigs and mice in different physiological situations – a comparative study. **Cells Tissues Organs**, v.173, p.105-144, 2003.

PENNISI, E. Tending tender tendons. **Science**, v.295, n.5557, p.1011, february, 2002.

PETERSEN, W. et al. Expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 in degenerative Achilles tendon. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.420, p.286-291, march, 2004.

ROCHA, J. Avaliações macroscópica e histológica do reparo da cartilagem articular equina tratada com microperfurações do osso subcondral associadas ou não a injeção intra-articular de cartogenina. **Pequisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.4, p.272-278, abril, 2016.

SANTSCHI, E. M. Articular fetlock injuries in exercising. **Veterinary Clinic North American Equine Practitioners**, v.24, n.1, p.117-132, april, 2008.

SATOMI, E. et al. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen promote adaptative remodeling in posterior tibial tendon rupture. **Clinical Science**. v.63, n.1, p.9-14, 2008.

SMITH, R. Diagnosis and management of soft tissue injuries in the fetlock region of athletic horses, in *Proceedings. 1st Brasil Horse Center Laboratório e Clínica Veterinária Conference*, v.1, p.109-123, 2013.

WEBBON, P.M. A postmortem study of equine digital flexors tendons. *Equine Veterinary Journal*, v.9, n.2, p.61-67, april, 1977.

6. DISCUSSÃO

As técnicas ultrassonográficas e radiográficas quando associadas e bem aplicadas equivalem à ressonância magnética. Aspectos ultrassonográficos se caracterizam pela observação da ecogenicidade, tamanho, forma e arquitetura dos tecidos (DENOIX, 1994).

Em relação as informações obtidas no MANUSCRITO I, observou-se as características ultrassonográficas, macroscópicas e histológicas dos componentes da articulação metacarpofalangeana normal, estabelecendo parâmetros no diagnóstico por imagem e a morfologia de cada estrutura avaliada. Relacionando variações de ecogenicidade e colorações macroscópicas a arquitetura histológica. Estes resultados complementam as citações de Denoix (2009) descrevendo que, a articulação metacarpofalangeana possui, no aspecto dorsal, uma espessa cápsula que mede aproximadamente 1mm e distalmente 0,5mm. Ela possui ainda um recesso dorsal fibroso próximo dorsalmente que contém pouco líquido sinovial em articulações sadias e outro recesso próximo palmar com inúmeras vilosidades sinoviais. A superfície da cartilagem articular e do osso subcondral podem ser visualizados com o membro na posição vertical apoiado sobre o solo, mas a avaliação do aspecto distal destas superfícies exige flexão da articulação. Exceto pelo aparelho suspensório (músculo interósseo III ou ligamento suspensório), ossos sesamoides proximais, ligamento intersesamoideano e ligamentos sesamoideanos esta articulação apresenta dois ligamentos colaterais simétricos formados por duas camadas, uma superficial, curta e oblíqua e outra, longa.

As características descritas no MANUSCRITO I serviram como base para o desenvolvimento dos dados obtidos no MANUSCRITO II observando-se a relação entre processos de degenerações da cartilagem articular a presença de entesopatias bilaterais dos ligamentos colaterais da articulação metacarpofalangeana. Concordando com Declercq et al. (2009), os danos à cartilagem articular da articulação metacarpo (tarso) falangeana estão associados a eventos traumáticos únicos ou a microlesões provocadas pela pressão suportada pela mesma. Observam-se com frequência lesões ósseas como fraturas condilares, fraturas de ossos sesamoides proximais e fragmentação osteocondral. As estruturas que compõem os tecidos moles desta articulação estão expostas a lesões devido a hiperextensão, instabilidade articular medial ou lateral e subluxações. Em um estudo realizado por King et al. (2013), lesões de tecidos moles como as de ligamentos colaterais ocorreram com maior frequência que as lesões subcondrais ou articulares. Em nossos estudos foi observado que alterações dos ligamentos colaterais e articulares ocorreram concomitantemente. O MANUSCRITO II

completa a correlação entre os achados ultrassonográficos e macroscópicos de alterações do cõndilo do III metacarpiano e ligamentos colaterais, estabelecendo a sensibilidade da técnica ultrassonográfica para avaliação destas estruturas. Corroborando com os trabalhos de Vanderperren & Saunders (2009) e Denoix (1996), a ultrassonografia tem sido a modalidade de diagnóstico por imagem mais utilizada para diagnosticar lesões de tendões e ligamentos e do aspecto dorsal da articulação metacarpofalangeana.

As alterações nos lobos da inserção proximal do ligamento suspensório como ecogenicidade, forma e tamanho são em alguns casos difíceis de serem diagnosticadas e nem sempre podem ser diferenciadas de forma confiável de achados normais. A quantidade de fibras musculares produz uma variação única de ecogenicidade na inserção proximal do ligamento suspensório (ZAUSCHER et al., 2013). O MANUSCRITO III aponta as diferenças ultrassonográficas e morfológicas da inserção proximal do ligamento suspensório na raça Crioulo quando comparadas a raça PSI, achados estes não descritos anteriormente. Dados obtidos complementam a interferência ecogênica do tecido adiposo presente em maior quantidade na periferia e no centro do ligamento a partir da observação de achados ultrassonográficos, macroscópicos e histológicos.

Os fascículos do tecido tendinoso são circundados por tecido conjuntivo frouxo contendo vasos sanguíneos, nervos, vasos linfáticos e fibras elásticas (WHITE & HEWES, 2008). O MANUSCRITO IV complementa por meio das técnicas de histoquímica a fragilidade e desorganização do tecido conjuntivo frouxo que, se encontra presente em processos cicatriciais do tecido tendinoso e ligamentar substituindo o tecido conjuntivo denso presente no interior dos fascículos. Em casos subagudos e crônicos, a neovascularização aumenta na área da lesão juntamente com a quantidade de células mesenquimais e fibroblastos que formam o tecido de granulação (STROMBERG, 1971). Ligamentos lesionados sofrem o processo normal de reparação incluindo inflamação com remoção de tecido lesado, proliferação e migração de fibroblastos que produzem tecido colágeno e remodelação do ligamento (SMITH & GOODSHIP, 2004).

8. CONCLUSÕES

O presente estudo abrangeu diferentes aspectos da articulação metacarpofalangeana e ligamento suspensório priorizando as dificuldades encontradas na rotina clínica quando examinando regiões com frequentes lesões, que ainda provocam divergências na sua interpretação por meio das técnicas de diagnóstico por imagem. No segundo manuscrito, por meio das técnicas radiográficas, ultrassonográficas e anatomopatológicas se observou a relação entre a degeneração da cartilagem articular do côndilo do III metacarpiano caracterizada por diminuição do espaço anecóico da cartilagem articular, irregularidades da superfície óssea e a fibrilação articular associadas a fibroplasia, neovascularização e metaplasia cartilaginosa dos ligamentos colaterais da articulação metacarpofalangeana. No terceiro manuscrito demonstrou-se diferenças como ecogenicidade, tamanho, forma, arquitetura e composição tecidual da inserção proximal do ligamento suspensório entre a raça Crioulo e a raça PSI. No quarto manuscrito, por meio da técnica de histoquímica caracterizou-se o tecido de substituição presente em processos cicatriciais de tendões e ligamentos bem como, a perda de matriz proteoglicana associada a fibrilação da cartilagem articular.

REFERÊNCIAS

- AGUT, A. et al. Ultrasonographic characteristics (cross-sectional area and relative echogenicity) of the digital flexor tendons and ligaments of the metacarpal region in Purebred Spanish horses. **The Veterinary Journal**, v. 180, p. 377-383, 2009.
- AMIEL, D. et al. Tendons and ligaments: A morphological and biochemical comparison. **Journal Orthopedic Research**, v. 1, p. 257-65, 1984.
- ALSOOK, M. K. Morphometric analyses of the body and the branches of the normal third interosseous muscle (suspensory ligament) in Standardbreds. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 42, n. 6, p. 461-470, Dec. 2013.
- ALSOOK, M. K. et al. Characterization of collagen fibrils after equine suspensory ligament injury: An ultrastructural and biochemical approach. **The Veterinary Journal**, v. 4, n. 1, p. 117-122, 2015.
- BARONE, R. Articulations metacarpal-phalangiennes. In: **Anatomies des Mammifères Domestiques - Tome 2: Arthrologie et Myologie**. Paris: Vigot, 1989, cap. 2, p.187-204.
- BERGLUND, M. et al. Patterns of mRNA expression for matrix molecules and growth factors in flexor tendon injury: differences in the regulation between tendon and tendon sheath. **The Journal of Hand Surgery**, v.31, n.8, p.1279-1287, Oct. 2006.
- BIRCH, H. L.; BAILEY, A. J.; GOODSHIP, A. E. Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, p. 391-396, 1999.
- BISCHOFBERGER, A. S. et al. Magnetic resonance imaging, ultrasonography and histology of the suspensory ligament origin: a comparative study of normal anatomy of Warmblood horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, p. 508-516, 2006.
- BLUNDEN, A. et al. Histopathology in horses with chronic palmar foot pain and age-matched controls. Part 2: the deep digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 1, p. 23-27, Jan. 2006.
- BLUNDEN, A.; MURRAY, R.; DYSON, S. J. Lesions of the deep digital flexor tendon in the digit: a correlative MRI and post mortem study in control and lame horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, p. 25-33, Jan. 2009.
- BUSONI, V. et al. Magnetic resonance imaging findings in the equine deep digital flexor tendon and distal sesamoid bone in advanced navicular disease – an ex vivo study. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 46, n. 4, p. 279-286, July 2005.
- BROKKEN, M. T. et al. Magnetic resonance imaging features of proximal metacarpal and metatarsal injuries in the horse. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 48, n. 6, p. 507-517, 2007.
- CALVE, S. et al. Engineering of functional tendon. **Journal of Tissue Engineering**, v. 10, n. 5-6, p. 755-761, 2004.

- CANTLEY, C. et al. Naturally occurring osteoarthritis in the metacarpophalangeal joints of wild horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 1, p. 73-81, Jan. 1999.
- CLAYTON, H. M., et al. Net joint moments and powers in the equine forelimb during the stance phase of the trot. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 30, p. 384–389, 1998.
- COHEN, N. D. et al. Results of 420 physical inspection before races and race-related characteristics and their association with 421 musculoskeletal injuries in Thoroughbreds during races. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.215, n.5, p.654-661, 1999.
- COLBORNE, G.R., et al. Forelimb joint moments and power during the walking stance phase of horses. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 59, p. 609–614, 1998.
- CREVIER-DENOIX, N. et al. Correlations between mean echogenicity and material properties of normal and disease equine superficial digital flexor tendons: an in vitro segmental approach. **Journal of Biomechanics**, v. 38, p. 2212-2220, 2005.
- CRISAN, M. I. et al. Vascular abnormalities of the distal deep digital flexor tendon in 8 draught horses identified with histological examination. **Research Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p. 23-26, Aug. 2013.
- DE BASTIANI, G. et al. Association of ultrasound and anatomopathologic findings of equine metacarpophalangeal lesions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 1218-1225, Aug. 2014.
- DECLERCQ, J. et al. Dorsoproximal proximal phalanx osteochondral fragmentation in 117 Warmblood horses. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, v. 22, p. 1-6, 2009.
- DENOIX, J. M. Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limbs (manus and pes). **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v. 10, n. 2, p. 273–322, 1994.
- DENOIX, J. M. Ultrasonography examination in the diagnosis of joint disease. In: MACILWRAITH, C.W.; TROTTER, G.W. **Joint Disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. Cap. 10, p.165-202.
- DENOIX, J. M. et al. Ultrasonographic anatomy of the dorsal and abaxial aspects of the equine fetlock. **Equine Veterinary Journal**, v.28, n.1, p.54-62, 1996.
- DENOIX, J.M. Ultrasonographic examination of joints in horses: a live demonstration. **Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association**, Guarujá, Brazil, p. 1-10, 2009.
- DENOIX, J. M.; AUDIGIE, F. Ultrasonographic examination of joint in horse. **Proceedings of the 47th Annual Convention American Association of Equine Practitioners**, San Diego, USA, p. 336-375, 2001.
- DENOIX, J. M.; BOUSSEAU, B.; CREVIER, N. Ultrasound examination of the fetlock in the horse. **Proceedings of the 3rd congress of World Equine Veterinary Association**, p. 103-108, 1993.

- DENOIX, J. M.; JACOT, S.; PERROT, P. Ultrasonographic examination of the dorsal and abaxial aspects of the equine fetlock. **Proceedings of the 41th Annual Convention American Association of Equine Practitioners**, San Diego, USA, p. 138-141, 1995.
- DENOIX, J. M. et al. Ultrasonographic anatomy of the dorsal and abaxial aspects of the equine fetlock. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, n. 1, p. 54-62, Jan. 1996.
- DIAMANT, J. et al. Collagen: ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 180, p. 293-315, 1972.
- DYMENT, N. A. et al. The paratendon contributes to scleraxis-expressing cells during patellar tendon healing. **Plos One**, v.8, n.3, p.1-11, march, 2013.
- DYSON, P.K. et al. Days lost from training by 394 two- and three-year-old Thoroughbred horses: a survey of seven UK training yards. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, p. 650-657, 2008.
- DYSON, S. Suspensory apparatus. In: **Equine Diagnostic Ultrasonography**. Oxford: Blackwell Publishing, 1998, p. 447-475.
- DYSON, S. Proximal suspensory desmitis: clinical, ultrasonographic and radiographic features. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, p. 25-31, 1991.
- DYSON, S. Proximal suspensory desmitis in the forelimb and the hindlimb. **Proceedings of the 46th Annual Convention American Association of Equine Practitioners**, San Diego, USA, p. 137-142, 2000.
- DYSON S.; GENOVESE R. The suspensory apparatus. In: ROSS M.; DYSON S. (eds): **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 2 ed. St Louis: Elsevier, 2011, p. 738-760.
- FUKASAWA, M. et al. Modulation of fibroblast proliferation by postsurgical macrophages. **Journal Surgery Research**, v. 43, n. 6, p. 513-520, Dec. 1987.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Color Textbook of Histology**. Philadelphia: Saunders, 1997, p. 92-108.
- GELBER, A. C. et al. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. **Ann. Intern. Med.**, v. 133, n. 5, p. 321-328, 2000.
- HALPER, J.; KHAN, A.; MUELLER, P. Degenerative Suspensory Ligament Desmitis-A New Reality. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 31, p. 1-8, 2011.
- HAUSER, M.L.; RANTANEN, N.W.; GENOVESE, R.L. Suspensory desmitis: diagnosis using real-time ultrasound imaging. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 4, p. 258-262, 1984.
- HAUSER, R. et al. Ligament injury and healing: A review of current clinical diagnostics and therapeutics. **The Open Rehabilitation Journal**, v. 6, p. 1-20, 2013.

HILL, A. E. et al. Evaluation of a stochastic Markov-chain model for the development of forelimb injuries in Thoroughbred racehorses. **Am. J. Vet. Res.**, v. 64, p. 328-337, 2003.

HILL, A. E. et al. Prevalence, location and symmetry of noncatastrophic ligamentous suspensory apparatus lesions in California Thoroughbred racehorses, and association of these lesions with catastrophic injuries. **Equine Veterinary Journal**, v. 48, n. 1, p. 27-32, Jan. 2016.

ISAAC, D.I. et al. Chronic changes in the rabbit tibial plateau following blunt trauma to the tibiofemoral joint. **Journal Biomechanic**, v. 43, n. 9, p. 1682-1688, June 2010.

KAWCAK C.E.; MCILWRAITH C.W. Proximodorsal first phalanx osteochondral chip fragmentation in 336 horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, p. 392-396, 1994.

KIDD, J. A.; FULLER, C.; BARR, A. R. S. Osteoarthritis in the horse. **Equine Veterinary Education**, v. 13, n. 3, p. 160-168, June 2001.

KING, J. N. et al. Findings in 232 horses with lameness localized to the metacarpo(tarso)phalangeal region and without a radiographic diagnosis. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 54, n. 1, p. 36-47, 2013.

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

LUI, P. et al. Ectopic chondro-ossification and erroneous extracellular matrix deposition in a tendon window injury model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 1, p. 37-46, Jan. 2012.

LUNDBORG, G.; RANK, F.; HEINAU, B. Intrinsic tendon healing: a new experimental model. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 19, n. 2, p. 113-117, 1985.

McBRIDE, D.J.; HAHN, R.A.; SILVER, F.H. Morphological characterization of tendon development during chick embryogenesis: measurement of birefringence retardation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 7, p. 71-76, Apr. 1985.

MOSKOWITZ, R. W.; GOLDBERG, V. M. Studies of osteophyte pathogenesis in experimentally induced osteoarthritis. **Journal Rheumatology**, v. 14, n. 2, p. 311-320, Apr. 1987.

MOW, V. C.; RATCLIFFE, A. Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: MOW, V.C., HAYES, W.C. **Basic Orthopaedic Biomechanics**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.514.

MURRAY, R.C. et al. The effects of strenuous training on equine carpal articular cartilage mechanical behaviour and morphology. **Trans Orthop. Res. Soc.**, v. 23, p. 200, 1998.

NIEMIR, Z. L. et al. Can Von Willebrand factor, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 and thrombomodulin be used as alternative markers of endothelial cell injury in human

glomerulonephritis? **Roczniki Akademmi Medycznej W Bialymstokw**, v. 49, p. 213-218, 2004.

NORRDIN, R.W.; STOVER, S.M. Subchondral bone failure in overload arthrosis: a scanning electron microscopic study in horses. **J. Musculoskelet Neuronal Interact.**, v. 6, n. 3, p. 251-257, 2006.

O'MEARA B. et al. An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the Thoroughbred racehorse. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 322-326, 2010.

OSHIRO, W. et al. Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. **The Journal of Hand Surgery**, v. 28, n. 5, p. 814-823, 2003.

PARMAR, B. J. et al. Characterization of controlled bone defects using 2D and 3D ultrasound imaging techniques. **Physics in Medicine and Biology**, v. 55, n. 16, p. 4839-4859, Aug. 2010.

PATTERSON-KANE, J. C. et al. Age-related differences in collagen crimp patterns in the superficial digital flexor tendon core region of untrained horses. **Australian Veterinary Journal**, v. 1, p. 39-44, 1997.

PATTERSON-KANE, J.; FIRTH, E. The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injuries in thoroughbred racehorses. **Vet J**, v. 181, p. 79-89, 2009.

POHLIN, F. et al. Anatomic and histologic features and ultrasonographic appearance of the collateral ligaments of the metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints in cadaveric limbs from horses without lameness. **American Journal of Veterinary Research**, v. 75, n. 12, p. 1089-1098, Dec. 2014.

POWELL, S. E. et al. Standing magnetic resonance imaging detection of bone marrow oedema-type signal pattern associated with subchondral bone pain in 8 racehorses: a prospective study. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 10-17, 2010.

RADIN, E. L. et al. Mechanical determinants of osteoarthritis. **Seminars in Arthritis Rheumatism**, v. 21, n. 3, p. 12-21, Dec. 1991.

REEF, V. B. Musculoskeletal ultrasonography. In: **Equine Diagnostic Ultrasound**. Philadelphia: Saunders, 1998. p. 39-79.

RELAVE, F. et al. Comparison of radiography and ultrasonography to detect osteochondrosis lesions in the tarsocrural joint: A prospective study. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, p. 34-40, Jan. 2009.

ROSS M.W.; DYSON S.J. (eds). **Diagnosis and management of lameness in the horse**. St. Louis: Elsevier, 2003, Cap. 3, p.342-399.

ROSS, M. W. Scintigraphic and clinical findings in the Standardbred metatarsophalangeal joint: 114 cases (1993-1995). **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n. 2, p. 131-138, 1998.

SANTSCHI, E. M. Articular fetlock injuries in exercising. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v. 24, n. 1, p. 117-132, Apr. 2008.

SATO, Y.; ABE, M.; TANAKA, K. Signal transduction and transcriptional regulation of angiogenesis. **Journal of Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 476, p. 109-115, 2000.

SCHARAMME, M.; JOSSON, A.; LINDER, K. Characterization of the origin and body of the normal equine rear suspensory ligament using ultrasonography, magnetic resonance imaging, and histology. **Vet Radiol Ultrasound**, v. 53, p. 318-328, 2012.

SILBERNAGEL, K. G. et al. Evaluation of lower leg function in patients with Achilles tendinopathy. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 14, p. 1207-1217, 2006.

SINGER, E. R. et al. Injuries in the event horse: Training versus competition. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 76–81, 2008.

SMITH, K. W; GOODSHIP, A. E. Tendon and ligament physiology. In: Hinchcliff , K.W. **Equine Sports Medicine and Surgery**. Philadelphia: Saunders, 2004. p. 130-151.

SMITH, R. K. W.; GOODSHIP, A. E. The effect of early training and the adaptation and conditioning of skeletal tissues. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v. 24, p. 37–51, Apr. 2008.

SOFFLER, C.; HERMANSON, J. W. Muscular design in the equine interosseus muscle. **Journal of Morphology**, v. 267: p. 696–704, 2006.

SOUZA, M. V. et al. Regional differences in biochemical, biomechanical and histomorphological characteristics of the equine suspensory ligament. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 611– 620, 2010.

STOVER, S. M.; MURRAY, A. The California Postmortem Program: leading the way. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v. 24, n.1, p. 21-36, 2008.

STROMBERG, B. The normal and disease superficial flexor tendon in race horses. A morphologic and physiologic investigation. **Acta Radiologica Supplementum**, Stockholm. v. 305, p. 1-94, 1971.

THOMPSON Jr., R.C. et al. Osteoarthrotic changes after acute transarticular load. An animal model. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 73, n. 7, p. 990-1001, 1991.

VANDERPERREN, K.; SAUNDERS, J. H. 2009. Diagnostic imaging of the equine fetlock region using radiography and ultrasonography. Part 2: The bony disorders. **The Veterinary Journal**, v. 181, n. 2, p. 123-136.

VANDERPERREN, K., et al. Evaluation of computed tomographic anatomy of the equine metacarpophalangeal joint. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 69, p. 631-638, 2008.

VANDERPERREN, K. et al. Ultrasonographic appearance of bony abnormalities at the dorsal aspect of the fetlock joint in geriatric cadaver horses. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 129-134, July 2011.

VOGEL, K. G. What happens when tendons bend and twist? Proteoglycans. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 4, n. 2 p. 202-203, June 2004.

WATTS, A. E. et al. A collagenase gel/physical defect model for controlled induction of superficial digital flexor tendonitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 5, p. 576-586, Sept. 2012.

WEBBON, P. M. A post mortem study of equine digital flexor tendons. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 2, p. 61-67, Mar. 1997.

WERPY, N. M.; DENOIX, J. M. Imaging of the equine proximal suspensory ligament. The Veterinary Clinics of North America. **Equine Practice**, v. 28, p. 507-525, 2012.

WERPY, N. M. et al. Comparison between standard ultrasonography, angle contrast ultrasonography, and magnetic resonance imaging characteristics of the normal equine suspensory ligament. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, n. 5, v. 54, p. 536-547, 2013.

WHITE, N. A.; HEWES, C. A. Treatment of suspensory ligament desmopathy. **Proceedings of the 54th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, San Diego, USA; 2008.

WIIG, M.; ABRAHAMSSON, S. O.; LUNDBORG, G. Tendon repair-cellular activities in rabbit deep flexor tendons and surrounding synovial sheaths and the effects of hyaluronan: an experimental study in vivo and in vitro. **The Journal of Hand Surgery**, v. 22, n. 5, p. 818-825, 1997.

WILLIAMS, M. R. et al. Microvasculature of the suspensory ligament of the forelimb of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 74, p. 1481-1486, 2013.

ZAUSCHER, J. M. et al. The proximal aspect of the suspensory ligament in the horse: How precise are ultrasonographic measurements? **Equine Veterinary Journal**, v. 45, p. 164-169, 2013.