

**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação

**Avaliação do Tratamento Intra-articular com Solução de  
Proteína Autóloga em Equinos**

**Ana Catarina Louçã Marreiros**

Orientador(es) | Susana Monteiro  
Elisa Maria Bettencourt  
Tomé António Fino Vitorino

Évora 2024





**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação

**Avaliação do Tratamento Intra-articular com Solução de  
Proteína Autóloga em Equinos**

Ana Catarina Louçã Marreiros

Orientador(es) | Susana Monteiro  
Elisa Maria Bettencourt  
Tomé António Fino Vitorino

Évora 2024

---

---

---

---



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ricardo Jorge Romão (Universidade de Évora)

Vogais | Rute Isabel Duarte Guedes dos Santos (Instituto Politécnico de Portalegre)  
(Arguente)  
Susana Monteiro (Universidade de Évora) (Orientador)

## **Agradecimentos**

Chegando ao culminar desta etapa tão esperada da minha vida, gostaria de agradecer a todos aqueles que me apoiaram incansavelmente nestes últimos seis anos para ir ao encontro do meu sonho:

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais por serem inspiração e exemplo de esforço, sacrifício e de entrega. Por serem sempre positivos, terem acreditado sempre em mim e me terem ensinado a lutar pelos meus objetivos. Sem vocês, isto não era possível!

Aos meus irmãos, João Tiago e Gonçalo, por estarem incondicionalmente ao meu lado para tudo o que for preciso, por serem o meu apoio e o meu motivo de orgulho desde o primeiro segundo. Convosco, este caminho tem outro sentido!

Ao meu namorado, Duarte, por acreditar em mim todos os dias, mesmo quando eu própria não o faço. Obrigada por todo o amor, compreensão e por me aturares incansavelmente nesta jornada. És uma inspiração para mim e tornas a minha vida melhor. Que sorte a minha te ter encontrado nesta cidade!

À Universidade de Évora e a todos os docentes que fizeram parte do meu percurso académico.

À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Susana Monteiro, pelo seu profissionalismo e disponibilidade em ajudar-me a realizar esta dissertação, mas também, por toda a ajuda a procurar lugares para estagiar fora de Portugal e por todos os conhecimentos que me transmitiu ao longo do curso.

Ao Dr. Tomé Fino pela sua disponibilidade e entusiasmo em aceitar acompanhar-me na realização desta dissertação. Por tudo o que me ensinou, pela confiança e pelo seu profissionalismo e dedicação que coloca em qualquer circunstância. Será sempre um exemplo para mim!

Aos médicos veterinários Beatriz Silva, Leonor Filipe, Ana Galhós, Tiago Bogarim por me transmitirem os seus conhecimentos e métodos de trabalho, por me desafiarem com as suas perguntas e por todas as viagens e pausas para almoço animadas. Aos meus colegas de estágio e a todas as outras pessoas que se cruzaram comigo durante o estágio curricular e que tornaram esta experiência ainda melhor.

À professora Dr<sup>a</sup>. Elisa Bettencourt pela sua disponibilidade na coorientação desta dissertação, mas também, por todos os ensinamentos teóricos e práticos ao longo do curso e por apoiar-me na realização de diferentes estágios extracurriculares.

À minha família por todo o apoio incondicional. Em especial, ao meu avô João por me ter transmitido desde pequenina esta paixão que é o mundo dos cavalos. À minha avó Helena, por todo o amor e preocupação em cuidar sempre de mim desde que pequenina. Onde quer que estejam sei que estão orgulhosos de mim! Aos meus avós Felisberto e Rosa, por terem contribuído pela minha paixão pelo campo, pelos animais e por todo o orgulho, amor e apoio que depositam em mim! Avós, em parte, isto está a acontecer e é graças a vocês!

Ao Alexandre, que para além de primo, é como um irmão para mim. Obrigada por tudo o que vivemos juntos, pela confiança e por toda a força que depositas em mim.

À Muy nobre e sempre leal cidade de Évora por ser a minha segunda casa e por me ter dado os melhores amigos que esta vida me deu: Aorta, Melissa, Táxi, Tó Zé, Tomás, Turista, Bruna, Sofia, Cláudio, Rodrigo, Nuno, Alice, Tolstoi, Jó, Madeixa e Maxime. Obrigada a todos vocês por tornarem estes últimos seis anos, os melhores e mais felizes da minha vida. Não tenho palavras para descrever a sorte e o orgulho que sinto na nossa amizade.

Em especial, quero agradecer à Aorta, a melhor amiga que o Alentejo me deu, a melhor colega de casa, colega de estudo e companheira de todas as horas. Obrigada por todos os momentos que vivemos, desde os mais ridículos aos mais bonitos. Estarei sempre aqui para ti, tal como tu estiveste e estás sempre para mim.

À restante família que Évora me deu por todos os momentos bonitos que vivemos. Ao meu padrinho Gui, Miguel Lourenço, Duarte, Catarina Pacheco, Tita, Di, Mafalda, Caniche e aos meus afilhados Mariana, Luana, Diogo, Flávia e a muitos outros amigos por mencionar que recordarei com muito carinho no meu coração.

Aos meus amigos algarvios e em especial à Raquel, Irina e Rui por toda a amizade, apoio, carinho e por tudo o que vivemos juntos no secundário. Levo para a vida vocês e todas as memórias que criamos.

E por fim aos meus amores de quatro patas: Cereja, Dylan, Hindy, Mel, Trovão e Fitas por serem os meus companheiros nesta jornada e por me fazerem apaixonar todos os dias mais pelo mundo da medicina veterinária. *A todos o meu agradecimento!*

## **Resumo**

### **Avaliação do Tratamento Intra-articular com Solução de Proteína Autóloga em Equinos**

A osteoartrite (OA) representa a afeção músculo-esquelética crónica mais importante no cavalo, sendo responsável por aproximadamente 60% das claudicações diagnosticadas.

A solução de proteína autóloga (APS) é uma terapia anti-inflamatória que contém uma elevada concentração de fatores de crescimento e que se tem tornado uma opção de interesse crescente.

Com o intuito de avaliar os efeitos do tratamento intra-articular com APS foi desenvolvido um estudo retrospectivo que incluiu 31 articulações de 21 equinos. O estudo demonstrou que a APS é eficaz e segura para o tratamento de OA ligeira em equinos. Além disso, demonstrou melhorias nas articulações que apresentaram efusão, lesões radiográficas moderadas e alterações ecográficas, contrariamente aos casos com dor óssea subcondral associada. A amostragem sugere que infiltrações repetidas podem ser determinadas pela severidade da claudicação inicial, mas mais estudos devem ser elaborados para confirmar estes achados.

**Palavras-chave:** Equino, Articulação, Osteoartrite, Terapia regenerativa, Solução de Proteína Autóloga

## **Abstract**

### **Evaluation of Intra-articular Treatment with Autologous Protein Solution in Horses**

Osteoarthritis (OA) represents the most important chronic musculoskeletal disorder in horses and is responsible for approximately 60% of diagnosed lameness.

Autologous protein solution (APS) is an anti-inflammatory therapy that contains a high concentration of growth factors and is gradually becoming an option of interest.

In order to evaluate the effects of intra-articular treatment with APS, a retrospective study was performed which included 31 joints from 21 horses. The study confirms that APS is effective and safe for the treatment of mild OA in horses. Also, it can have a positive response in cases presenting effusion, moderate radiographic lesions, and ultrasound changes but not in cases with subchondral bone pain. The sample suggests that repeated injections can be determined by the initial lameness severity, but further studies should be performed to confirm these findings.

**Key-words:** Equine, Joint, Osteoarthritis, Regenerative Therapy, Autologous Protein Solution.

# Índice geral

<b>Agradecimentos</b> .....	I
<b>Resumo</b> .....	III
<b>Abstract</b> .....	IV
<b>Índice de tabelas</b> .....	IX
<b>Índice de gráficos</b> .....	X
<b>Índice de figuras</b> .....	XI
<b>Abreviaturas, siglas e símbolos</b> .....	XIII
<b>Preâmbulo</b> .....	1
<b>I - Revisão bibliográfica</b> .....	2
<b>1. Anatomia e fisiologia geral das articulações e estruturas sinoviais</b> .....	2
<b>1.1 A articulação</b> .....	2
<b>1.2 Classificação</b> .....	2
<b>1.3 Anatomia geral das estruturas sinoviais</b> .....	2
<b>1.3.1 Cartilagem articular</b> .....	3
1.3.1.1 Colagénio.....	5
1.3.1.2 Proteoglicanos (PGs).....	5
1.3.1.3 Proteínas não colagénicas.....	6
1.3.1.4 Componente celular.....	6
<b>1.3.2 Osso subcondral</b> .....	6
<b>1.3.3 Cápsula articular</b> .....	8
<b>1.3.4 Líquido sinovial</b> .....	8
<b>1.4 Fisiologia e biomecânica da articulação</b> .....	8
<b>1.4.1 Lubrificação articular</b> .....	9
<b>1.4.2 Mecanismo de percepção de dor</b> .....	10

<b>2. Osteoartrite (doença articular degenerativa)</b> .....	10
<b>2.1 Fatores de risco</b> .....	11
<b>2.2 Etiopatogenia</b> .....	12
<b>2.2.1 Metaloproteinases (MPs)</b> .....	13
<b>2.2.2 Prostaglandinas E<sub>2</sub></b> .....	14
<b>2.2.3 Radicais livres de oxigênio</b> .....	14
<b>2.2.4 Citoquinas</b> .....	14
<b>2.2.5 Fatores de crescimento</b> .....	15
<b>2.2.6 A influência da doença primária do osso subcondral no desenvolvimento da OA</b> .....	16
<b>2.2.7 Mecanismos de alteração morfológica da CA</b> .....	16
<b>2.2.8 Mecanismos de reparação da cartilagem</b> .....	18
<b>2.3 Sinais clínicos</b> .....	18
<b>2.4 Diagnóstico</b> .....	19
<b>2.4.1 Exame locomotor</b> .....	19
<b>2.4.2 Radiografia</b> .....	21
<b>2.4.3 Ultrassonografia</b> .....	22
<b>2.4.4 Ressonância Magnética</b> .....	23
<b>2.4.5 Cintigrafia nuclear</b> .....	24
<b>2.4.6 Tomografia computadorizada</b> .....	25
<b>2.4.7 Artroscopia</b> .....	26
<b>2.4.8 Análise do líquido sinovial</b> .....	27
<b>2.4.9 Biomarcadores da OA</b> .....	28
<b>2.5 Abordagem terapêutica à osteoartrite</b> .....	29
<b>2.5.1 Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)</b> .....	29
<b>2.5.2 Corticosteroides</b> .....	30

2.5.3	Suplementação com ácido hialurônico (AH).....	31
2.5.4	Glicosaminoglicanos polissulfatados (PSGAG) .....	32
2.5.5	Formulação terapêutica: AH, sulfato de condroitina e N-acetil-D-glucosamina.....	32
2.5.6	Polissulfato de pentosano (PPS) .....	33
2.5.7	Bifosfonatos (BPs).....	33
2.5.8	Dimetilsulfóxido (DMSO) .....	34
2.5.9	Suplementação oral: Nutracêuticos .....	35
2.5.10	Gel de poliacrilamida .....	35
2.5.11	Terapias biológicas .....	36
2.5.11.1	Células estaminais mesenquimais (MSCs).....	36
2.5.11.2	Terapia genética.....	36
2.5.11.3	Soro autólogo condicionado (ACS ou IRAP).....	37
2.5.11.4	Plasma rico em plaquetas (PRP).....	38
2.5.12	Reabilitação física .....	39
2.5.13	Ferração ortopédica .....	40
3.	Solução de proteína autóloga (APS): opção promissora para o tratamento de osteoartrite? .....	40
3.1	Solução de proteína autóloga.....	41
3.2	Preparação da APS – Kit Pro-Stride® .....	42
3.2.1	Material: .....	42
3.2.2	Preparação (passo a passo):.....	43
3.3	Protocolo terapêutico e requisitos .....	45
3.4	Composição da APS.....	45
3.5	Mecanismo de ação da APS .....	46
3.6	Comparação entre APS e ACS.....	48

3.7	Vantagens da APS .....	49
3.8	Desvantagens da APS .....	49
3.9	Outras espécies-alvo do tratamento .....	50
<b>II – Estudo .....</b>		<b>52</b>
<b>4.</b>	<b>Avaliação do Tratamento Intra-articular com Solução de Proteína Autóloga em Equinos: Estudo retrospectivo .....</b>	<b>52</b>
4.1	Introdução .....	52
4.2	Objetivos .....	53
4.3	Material e métodos .....	54
4.3.1	Seleção da amostra e obtenção de dados .....	54
4.3.2	Avaliação radiográfica .....	55
4.3.3	Análise estatística .....	55
4.4	Resultados .....	56
4.4.1	Análise descritiva: caracterização da população (idade, sexo, raça, disciplina) .....	56
4.4.2	Análise descritiva: dados antes do tratamento IA com APS .....	57
4.4.3	Análise descritiva: dados após o tratamento IA com APS .....	64
4.4.4	Testes estatísticos .....	65
4.5	Discussão .....	70
4.6	Conclusão .....	79
<b>Referências bibliográficas .....</b>		<b>81</b>
<b>Anexo 1 .....</b>		<b>i</b>
<b>Anexo 2 .....</b>		<b>ii</b>

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Sistema de classificação de claudicação AAEP .....	20
Tabela 2 - Dosagem e tempos de detecção dos corticosteroides administrados por via IA. .....	31
Tabela 3 - Maneio da OA aplicado aos objetivos da reabilitação física.....	39
Tabela 4 - Sistema de classificação radiográfica.....	55
Tabela 5 - Caracterização da amostra populacional (n=21). .....	57
Tabela 6 - Dados clínicos da amostra populacional em estudo. ....	i
Tabela 7 - Discriminação dos tratamentos por articulação e por membro. ....	ii
Tabela 8 – Testes estatísticos (Correlação de Spearman e Teste do qui-quadrado) para análise da relação entre as variáveis: "grau radiográfico" e "grau de claudicação". ....	ii
Tabela 9 – Teste estatístico de Mann-Whitney para análise da relação entre as variáveis: "grau radiográfico" e presença/ausência de "dor à FP e à FA" e “necessidade de 2ª administração de APS”. .....	ii
Tabela 10 – Teste estatístico de Mann-Whitney para análise da relação entre as variáveis: “grau de claudicação" e "necessidade de 2ª administração de APS". .....	iv
Tabela 11 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis para análise da relação entre as variáveis: "grau de claudicação" e "resposta à APS". .....	iv
Tabela 12 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis para análise da relação entre as variáveis: "grau radiográfico" e "resposta à APS" .....	iv
Tabela 13 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis para análise da relação entre as variáveis: "grau de efusão clínica" e "resposta à APS". .....	iv
Tabela 14 - Teste estatístico do Qui-quadrado para análise da relação entre a "resposta à APS" e as variáveis: "dor à flexão passiva e à flexão ativa" e "efusão clínica". .....	v

## Índice de gráficos

Gráfico 1 - Localização das articulações com lesões por membro (n=31).....	57
Gráfico 2 - Estrutura sinovial da localização das lesões (n=31).....	58
Gráfico 3 - Grau de claudicação respetivo às articulações em estudo (n=31).....	59
Gráfico 4 - Testes de dor à flexão passiva e de dor à flexão ativa respetivos às articulações em estudo (n=31). ....	59
Gráfico 5 - Grau de efusão articular (n=31). ....	60
Gráfico 6 - Distribuição (%) dos casos com e sem tratamentos anteriores à APS (n=31). .....	63
Gráfico 7 - Resposta clínica à APS (n=31). ....	64
Gráfico 8 - Necessidade de 2ª administração de APS em função da resposta ao primeiro tratamento com APS (n=31). ....	65
Gráfico 9 - Distribuição da variável “grau de claudicação” antes da primeira infiltração pela “necessidade de segunda administração de APS” (n=31).....	67
Gráfico 10 - Distribuição do “grau de claudicação” em função da “resposta à terapia” (n=31). ....	67
Gráfico 11 - Distribuição do "grau radiográfico" em função da "resposta à terapia" (n=31). .....	68
Gráfico 12 - Distribuição do "grau de efusão clínica" em função da "resposta à terapia" (n=31). ....	69
Gráfico 13 - Distribuição do "grau (score) radiográfico" por "dor à flexão passiva". ....	iii
Gráfico 14 - Distribuição do "grau (score) radiográfico" por "dor à flexão ativa". ....	iii
Gráfico 15 - Distribuição do "grau (score) radiográfico" por "necessidade de 2ª administração de APS". ....	iii

## Índice de figuras

Figura 1 -Representação esquemática da articulação sinovial .....	3
Figura 2 - Representação esquemática da composição da cartilagem articular .....	4
Figura 3 – Esquema representativo do desenvolvimento de OA.....	7
Figura 4 - Diagrama simplificado do ciclo vicioso da lesão osteocondral e degradação da MEC que contribuem para a dor associada à OA.....	10
Figura 5 - Representação esquemática dos fatores envolvidos na degradação enzimática da MEC.....	13
Figura 6 - Diagrama representativo das vias de degradação da cartilagem articular secundária a traumas em equinos .....	17
Figura 7 - Representação do desenvolvimento de OA na articulação do boleto secundária a trauma cíclico e sinovite e capsulite traumáticas.....	17
Figura 8 - Radiografia em projeção Dorsolateral-Palmaromedial Oblíqua (DLPMO) da articulação do boleto.....	19
Figura 9 - Radiografia em projeção Dorso-Palmar (DP) com as variações anatómicas normais entre as articulações MCF, IFP e IFD .....	21
Figura 10 - Radiografia em projeção DP com redução do espaço articular do aspeto medial da articulação IFP .....	21
Figura 11 - Ultrassonografia de sinovite aguda da articulação do boleto .....	22
Figura 12 - OA da articulação IFD com formação de novo osso na superfície dorsal da segunda falange (P2) .....	23
Figura 13 - Ultrassonografia de várias localizações e formações dos osteófitos .....	23
Figura 14 - (A) - Radiografia em projeção DP 30° da articulação IFP. (B) – Ressonância magnética da articulação IFP.....	24
Figura 15 - Cintigrafia nuclear de quatro boletos (MCF e MTF) de um poldro com três anos de idade com claudicação bilateral dos membros posteriores.....	25
Figura 16 - Tomografia computadorizada em plano transversal da região distal do metacarpiano III.....	26
Figura 17 - Artroscopias (A) - Aspeto medial da articulação inter-cárpica com erosão da CA e osteófito no osso carpal radial e menor degradação da cartilagem na superfície	

oposta do terceiro osso carpal. <b>(B)</b> – Articulação MCF com linhas de uso indicativas de fase precoce de OA.....	27
Figura 18 - Artroskopias <b>(C)</b> - Articulação MCF com erosão focal da CA no côndilo medial do metacarpiano III. <b>(D)</b> - Articulação inter-cárpica com erosão severa da CA no osso carpal radial .....	27
Figura 19 - Análise do líquido sinovial .....	28
Figura 20 - Aparência histológica do PRP .....	38
Figura 21 - Kit de solução de proteína autóloga (APS) à <b>esquerda</b> ; seringas Omnifix <b>no centro</b> e Luer Lock à <b>direita</b> .....	42
Figura 22 - Centrifugadora usada para a preparação da solução de proteína autóloga....	42
Figura 23 - Colheita de sangue venoso com seringa Omnifix de 60ml acoplada a cateter borboleta. Notar assepsia da região. ....	43
Figura 24 – Método de preparação da APS – <b>kit Pro-Stride®</b> (passo a passo). ....	44
Figura 25 - Composição e mecanismo de ação da APS .....	47
Figura 26 – Projeções radiográficas LM ( <b>esquerda</b> ) e DP ( <b>direita</b> ) da articulação MCF (MAE) correspondentes ao cavalo 15. <b>Grau radiográfico = 0</b> .....	61
Figura 27 – Projeções radiográficas DMPLO ( <b>esquerda</b> ) e DLPMO ( <b>direita</b> ) da articulação MCF (MAE) correspondentes ao cavalo 21. <b>Grau radiográfico = 1</b> .....	61
Figura 28 - Projeções radiográficas LM ( <b>esquerda</b> ) e DLPMO ( <b>direita</b> ) da articulação MCF (MAE) correspondentes ao cavalo 7. <b>Grau radiográfico = 2</b> . ....	62
Figura 29 - Projeções radiográficas LM ( <b>esquerda</b> ) e DLPMO ( <b>direita</b> ) da articulação MCF (MAD) correspondentes ao cavalo 7. <b>Grau radiográfico = 3</b> .....	62

## **Abreviaturas, siglas e símbolos**

- AAEP** - *American Association of Equine Practitioners* (Associação Americana de Médicos Veterinários de Equinos)
- ACS** - *Autologous Conditioned Serum* (Soro Condicionado Autólogo)
- AD** - Anterior Direito
- AE** - Anterior Esquerdo
- AH** - Ácido Hialurônico
- AINEs** - Anti-Inflamatórios Não Esteroides
- BID** - Duas vezes por dia
- BPs** - Bifosfonatos
- CA** - Cartilagem Articular
- COX-2** - Ciclo-Oxigenase-2
- DLPMO** -Dorsolateral-Palmaromedial Oblíqua
- DMOAD** - *Disease-Modifying Osteoarthritis Drug* (Droga Modificadora da Doença Osteoartrite)
- DMPLO** - Dorsomedial-Palmarolateral Oblíqua
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DP** - Dorso-Palmar
- EGF** – *Epidermal Growth Factor* (Fator de Crescimento Epidérmico)
- FA** - Flexão Ativa
- FEI** - Federação Equestre Internacional
- FP** - Flexão Passiva
- GAG** - Glicosaminoglicanos
- IA** - Intra-articular
- IFD** - Inter-falângica Distal
- IFP** - Inter-falângica Proximal
- IGF-1** - *Insulin-like Growth Factor 1* (Fator de Crescimento Tipo Insulina-1)
- IL** - Interleucina
- IL-1Ra** - Recetor Antagonista da IL-1
- IM** - Intramuscular
- ITD** - Intertársica Distal
- IV** - Intravenosa

**LM** - Latero-Medial

**MCF** - Metacarpo-falângica

**MEC** - Matriz Extracelular

**MPs** - Metaloproteinases

**MSCs** - *Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais)

**MTF** - Metatarso-falângica

**NF- $\kappa$ B** - Fator Nuclear Kappa B

**NO** - Óxido Nítrico

**OA** - Osteoartrite

**PD** - Posterior Direito

**PDGF** - *Platelet Derived Growth Factor* (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)

**PE** - Posterior Esquerdo

**PGs** -Proteoglicanos

**PO** - *Per Os*

**PPS** - *Pentosan Polysulfate* (Polissulfato de Pentosano)

**PRP** - Plasma Rico em Plaquetas

**PSGAG** - *Polysulfated Glycosaminoglycans* (Glicosaminoglicanos Polissulfatados)

**P1** - Primeira falange ou Falange proximal

**P2** - Segunda falange ou Falange média

**SID** - Uma vez por dia

**SMOAD** - *Symptom-Modifying Osteoarthritis Drug* (Droga Modificadora dos Sinais Clínicos da Doença Osteoartrite)

**TGF** - *Transforming Growth Factor* (Fator de Crescimento Transformador)

**TMT** - Tarsometatársica

**TIMP** - Tecido Inibidor das Metaloproteinases

**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose de Tumores- $\alpha$

**TT** -Tibiotársica

## **Preâmbulo**

A presente dissertação foi redigida com base no estágio curricular com duração de quatro meses, com início a 3 de outubro de 2022 e término a 31 de janeiro de 2023, em regime de ambulatório sob orientação externa do Dr. Tomé Fino, sócio-gerente da empresa Equimuralha, em Évora.

Durante o referido estágio, a aluna teve a oportunidade de contactar com diferentes áreas da clínica e cirurgia equina, entre as quais se destacaram a ortopedia (inclusive exames em ato de compra (EAC)) e reabilitação, medicina interna (gastroenterologia, pneumologia, neurologia, cardiologia, oftalmologia, dermatologia e oncologia), odonto-estomatologia, parasitologia e reprodução. Ainda que com menor frequência, a clínica de asininos e muares também esteve presente.

O facto de a equipa ser composta por diferentes médicos veterinários aliado à elevada casuística da empresa, permitiu à aluna experienciar diferentes metodologias de trabalho, partilhar conhecimentos e perceber em concreto, a realidade do ambulatório em Portugal.

Atendendo à crescente evolução da medicina desportiva em Portugal e tendo em consideração os poucos estudos descritos até hoje sobre a administração de solução de proteína autóloga em equinos com osteoartrite, surgiu o interesse de ser elaborado um estudo retrospectivo sobre a aplicação deste tipo de tratamento.

# **I - Revisão bibliográfica**

## **1. Anatomia e fisiologia geral das articulações e estruturas sinoviais**

### **1.1 A articulação**

As articulações são órgãos complexos e altamente diferenciados que representam um elemento essencial no sistema músculo-esquelético do cavalo. São compostas por variados tecidos incluindo, ósseo, cartilágneo articular e ainda tecidos moles periarticulares que em conjunto, contribuem para a sua função normal<sup>1,2</sup>. Em particular, apresentam uma elevada resistência, comparável à dos ossos, permitindo a transmissão de forças de forma sustentada durante a locomoção. Possuem superfícies lisas para garantir um deslizamento suave e sem atrito entre as extremidades ósseas e ainda, elevada resiliência para absorção de choques e vibrações associadas ao impacto dos cascos no solo<sup>1</sup>.

### **1.2 Classificação**

As articulações são classificadas relativamente à sua constituição em articulações fibrosas, que conectam os ossos através de tecido conjuntivo denso (exemplo: intervertebrais com exceção das duas primeiras cervicais (C1-C2)); articulações cartilaginosas, cuja interface é a cartilagem fibrosa ou hialina (exemplo: sínfise púbica); e em articulações sinoviais que são constituídas por uma cavidade preenchida por líquido sinovial<sup>1</sup>. Em relação ao grau de movimento, são classificadas em 3 tipos: sinartroses, articulações com mobilidade reduzida (de natureza fibrosa); anfiartroses, com mobilidade ligeiramente superior às anteriores, mas ainda limitada; e as diartroses, ou também designadas por articulações sinoviais, com mobilidade total. As diartroses pertencem ao esqueleto apendicular do cavalo pelo que, estão envolvidas na claudicação associada à doença articular degenerativa<sup>3</sup>.

### **1.3 Anatomia geral das estruturas sinoviais**

As articulações sinoviais são estruturalmente constituídas por cartilagem articular, que envolve toda a superfície óssea articular, e o osso subcondral, conectados através de uma camada de cartilagem calcificada. Ambos são envolvidos por uma cápsula

articular preenchida por líquido sinovial (Figura 1). Para estabilizar este tipo de articulação e restringir o movimento em direções erráticas, existem estruturas adicionais como os ligamentos peri e intra-articulares<sup>1</sup>. Além disso, a pressão hidrostática negativa presente na cápsula articular cria um efeito de “sucção” que confere estabilidade adicional às articulações<sup>3</sup>.

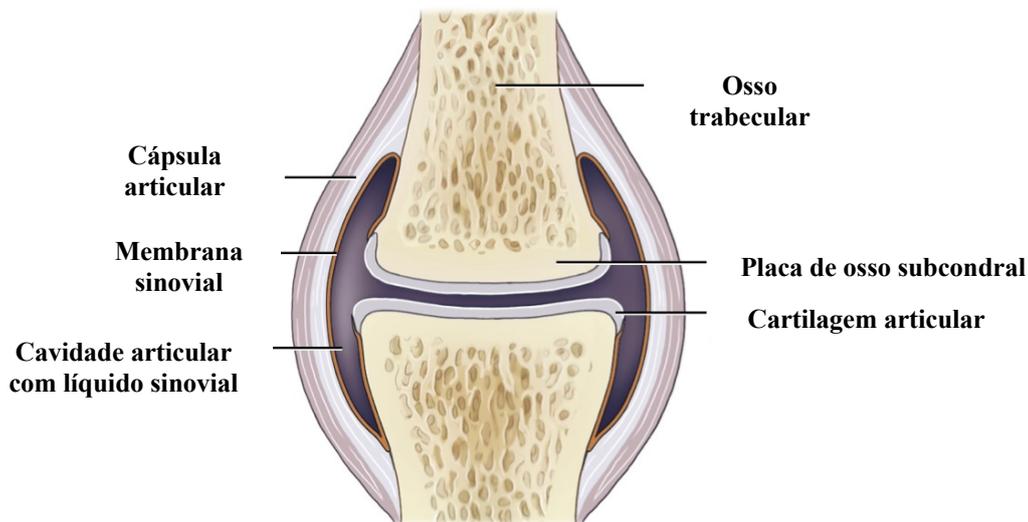


Figura 1 -Representação esquemática da articulação sinovial. (Adaptado de <sup>1</sup>)

### 1.3.1 Cartilagem articular

A organização espacial dos componentes da CA favorece as suas propriedades biomecânicas de absorção de choques e de transmissão de forças, gerando movimentos contínuos e sem fricção. É um tecido desprovido de vasos sanguíneos e linfáticos e de nervos. Em particular, a ausência de inervação sensorial parece estar associada ao início insidioso da osteoartrite, quando as primeiras alterações se resumem somente à CA<sup>4</sup>. Com efeito, a sua nutrição é feita por difusão do líquido sinovial e a superfície de apoio está dependente das terminações nervosas da cápsula articular, osso subcondral e dos ligamentos periarticulares para fins nociceptivos e proprioceptivos<sup>3</sup>.

Estruturalmente, a CA é constituída por uma escassa componente celular, os condrócitos (cerca de 1-12% do volume) e pela matriz extracelular (MEC). A MEC é constituída por água (entre 70-80%) e por uma componente seca (entre 20-30%) composta maioritariamente por colagénio (50%), proteoglicanos (PGs) (35%), glicoproteínas tais como proteinases e respetivos inibidores, fatores de crescimento, *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), entre outras (10%) e ainda, minerais, lípidos e outros elementos diversos (5%)<sup>1</sup>.

Podem distinguir-se quatro camadas (Figura 2):

- a) **Camada superficial (ou tangencial)** – composta por condrócitos achatados ou ovoides, elevada densidade de fibrilas de colagénio tipo II paralelas à superfície, PGs em quantidade reduzida e um elevado teor em água<sup>1,3</sup>;
- b) **Camada intermédia (ou de transição)** – composta por condrócitos arredondados dispersos irregularmente pela MEC, menor densidade de colagénio, PGs em maior número e um teor de água inferior à zona superficial<sup>1,3</sup>;
- c) **Camada profunda (ou radial)** – caracterizada por condrócitos dispostos perpendicularmente em relação ao osso subcondral, pela menor densidade de fibrilas de colagénio dispostas radialmente, a maior quantidade de PGs e o menor teor em água<sup>1,3</sup>.

Em particular, podemos discernir um padrão em relação aos teores de cada um dos componentes da CA. Ou seja, à medida que a profundidade da CA aumenta, maior o teor em PGs e menor o teor em colagénio e água.

- d) **Camada de cartilagem calcificada** – constituída por condrócitos em várias fases de degeneração. Corresponde à interface entre a camada profunda da cartilagem e o osso subcondral. As primeiras três camadas compõem a porção hialina da cartilagem, que é separada da camada calcificada, menos resiliente, através de uma estrutura irregular e tridimensional denominada por *tidemark* (“frente de mineralização”)<sup>1,3</sup>.

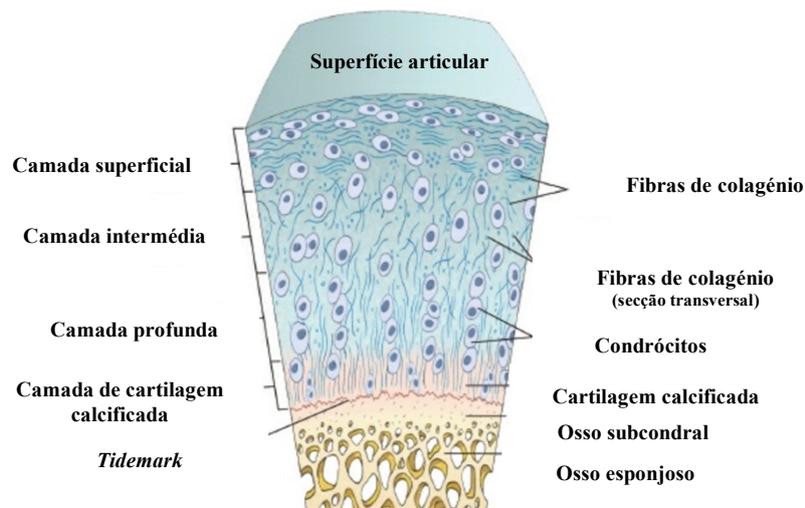


Figura 2 - Representação esquemática da composição da cartilagem articular. (Adaptado de <sup>3</sup>)

#### 1.3.1.1 Colagénio

São as proteínas mais abundantes da MEC, sendo fundamentais para a biomecânica normal da CA. Em particular, o tipo II é o principal tipo de colagénio presente na cartilagem dos animais adultos, representando cerca de 90-95% do colagénio total<sup>1</sup>.

A rede de colagénio é uma estrutura tridimensional cujas fibrilas emergem da camada calcificada e seguem perpendicularmente pela camada profunda. Seguidamente, pela camada intermédia, alteram a sua direção, assumindo uma configuração arqueada até à camada superficial da cartilagem, onde as fibrilas estão organizadas paralelamente. A configuração definitiva da rede de colagénio, tipicamente designada por padrão de *Benninghoff*, só é concretizada no período juvenil e relaciona-se com a direção predominante das forças aplicadas, podendo assim variar entre as diferentes articulações<sup>1</sup>. Em menor número, existem ainda os colagénios tipo VI, IX, XI, XII e XIV, que conferem estabilidade à rede de colagénio fibrilar tipo II<sup>3</sup>. O colagénio tipo X é específico das cartilagens dos animais jovens, que apresentam um processo ativo de ossificação endocondral e ainda, em processos iniciais de osteoartrite em adultos com lesões nas cartilagens<sup>1</sup>.

#### 1.3.1.2 Proteoglicanos (PGs)

O monómero do PG é constituído por uma proteína central e cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAG) – sulfato de queratina e sulfato de condroitina. Dada à sua natureza polianiónica (radicais carboxilo e sulfato), os GAG são responsáveis pela retenção de água na MEC e consequentemente, por conferirem rigidez compressiva e capacidade absorviva de forças à CA<sup>3</sup>.

Os agregados de PGs estão localizados nos espaços entre as fibrilas de colagénio e ligam-se diretamente a estas ou através de moléculas de ácido hialurónico (AH). Em particular, o AH é o principal componente da MEC presente na CA embora, também esteja presente no líquido sinovial. A maioria dos PGs ligam-se ao AH para formar o *agrecan*, o principal agregado presente na MEC. Note-se que, em animais mais velhos ou em caso de lesão, o *agrecan* pode ser degradado<sup>5</sup>.

#### 1.3.1.3 Proteínas não colagénicas

Além do colagénio e dos PGs, a CA é constituída por proteínas estruturais não colagénicas. Neste grupo incluem-se as *equine link proteins* (LP1, LP2, LP3), condronectinas, fibronectinas, fatores de crescimento e as *cartilage oligomeric matrix proteins* (COMP) envolvidas na formação da CA em animais jovens e na manutenção da sua integridade em animais adultos<sup>6</sup>.

#### 1.3.1.4 Componente celular

Corresponde aproximadamente a 1-12% de toda a CA e neste grupo estão incluídas as células progenitoras da cartilagem articular e os condrócitos. Os condrócitos localizam-se em lacunas presentes da MEC e são responsáveis pela síntese dos seus constituintes, nomeadamente colagénio, PGs e ainda, enzimas proteolíticas (equilíbrio síntese/degradação da MEC). Isto deve-se à interação complexa que existe entre os condrócitos, que possuem um prolongamento (cílio) que penetra no interior da matriz e deteta alterações biomecânicas do ambiente articular<sup>3</sup>. Note-se que estas células não se encontram ligadas entre si e que a sua morfologia varia entre a camada superficial, com forma achatada, e a camada mais profunda, com forma arredondada e metabolicamente mais ativa<sup>1</sup>.

### **1.3.2 Osso subcondral**

O osso subcondral suporta a cartilagem articular e liga-se intimamente a esta através da camada de cartilagem calcificada. Estruturalmente, possui uma placa de osso compacto adjacente à porção de cartilagem calcificada e uma placa de osso trabecular, na zona mais profunda. Biomecanicamente, o osso subcondral desempenha uma função fundamental de atenuação das forças mecânicas geradas durante o exercício. Neste sentido, a placa de osso compacto fornece suporte e rigidez adicionais que, em caso de esclerose, podem ser substancialmente superiores e prejudiciais para a carga mecânica da CA enquanto, que a placa de osso trabecular confere elasticidade e resiliência, permitindo ao osso adaptar-se às cargas a que é sujeito. Em processos de remodelação óssea ocorrem alterações na espessura e na arquitetura de ambas as placas ósseas por intermédio da atividade anabólica (osteoblastos) e catabólica (osteoclastos). Exemplo disso, é a esclerose subcondral, em que há uma diminuição da elasticidade e por outro lado, um

espessamento das placas ósseas, favorecendo o aparecimento de OA. Embora controverso, estas considerações levaram à criação da teoria que defende que a esclerose subcondral pode ser um fator primário e não um sinal secundário de OA. Ainda que a opinião atual considere a CA como o tecido onde se inicia a OA, é evidente que os processos degenerativos e reativos na cartilagem e no osso subcondral estão intrinsecamente ligados e se influenciam mutuamente desde as fases mais iniciais da doença<sup>1</sup> (Figura 3<sup>7</sup>).

Em contraste com a CA, o osso subcondral é altamente vascularizado e innervado o que se traduz numa atividade metabólica e numa taxa de *turnover* consideravelmente superiores. A inervação do osso subcondral é um dos principais meios de percepção de dor em caso de doença articular, em conjunto com os nociceptores da cápsula articular e dos ligamentos -intra e extra-articulares<sup>1</sup>.

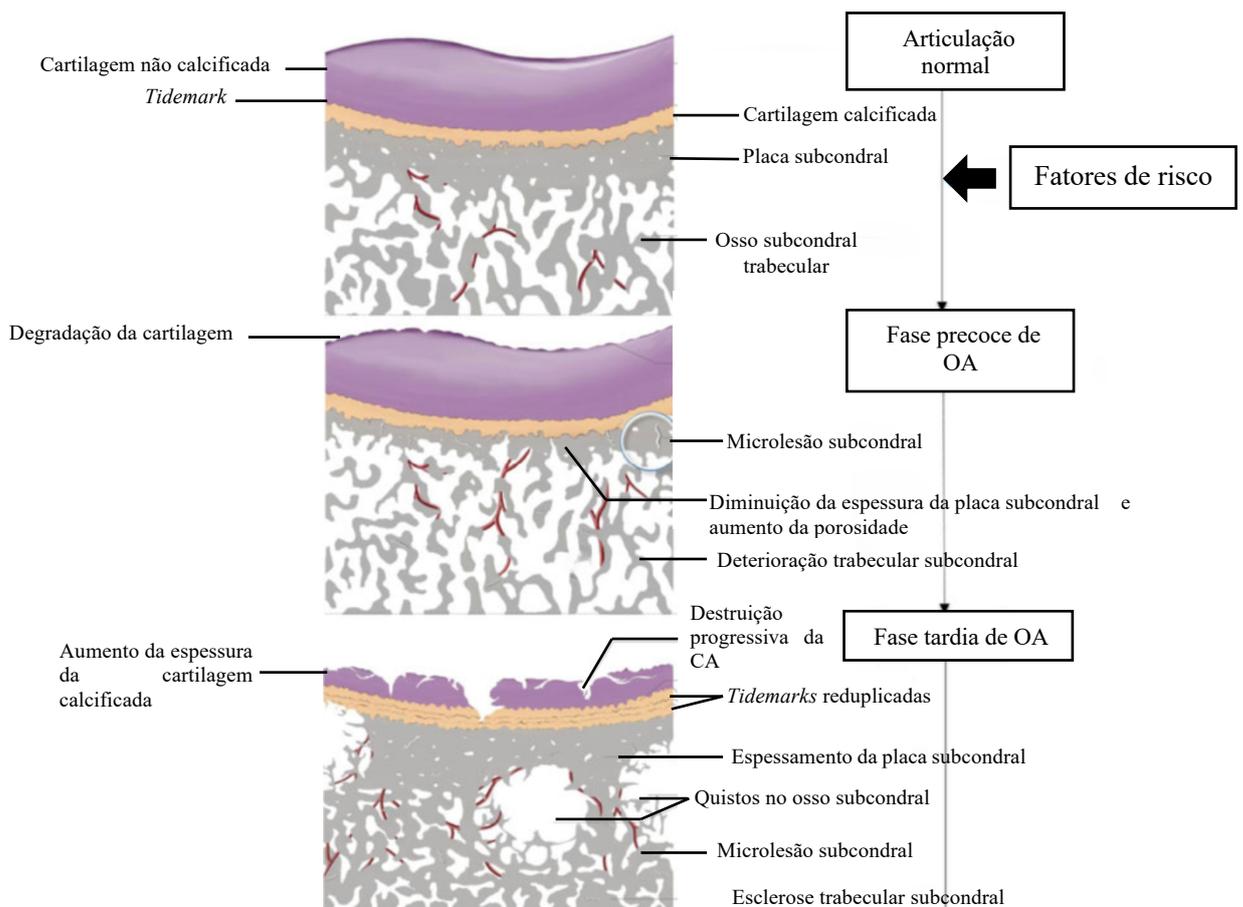


Figura 3 – Esquema representativo do desenvolvimento de OA. (Adaptado de <sup>7</sup>)

### **1.3.3 Cápsula articular**

A cápsula articular está organizada em duas camadas, a externa e a interna. A camada externa é formada por tecido fibroso e contacta diretamente com as estruturas periarticulares, conferindo estabilidade mecânica adicional. Possui ainda terminações nervosas propriocetivas e nociceptivas. Em contraste, a camada interna, comumente designada por membrana sinovial, organiza-se em duas camadas: íntima e subíntima. A subíntima, composta por tecido conjuntivo laxo, é muito vascularizada e inervada. A íntima, como o nome indica, está intimamente ligada à cavidade articular pois apenas possui entre uma a quatro células (espessura muito reduzida), denominadas por sinoviócitos, e é desprovida de membrana basal. Por esta razão, e igualmente devido à proximidade imediata dos numerosos vasos sanguíneos, existe uma rápida e facilitada passagem de elementos do plasma para a cavidade sinovial. Os sinoviócitos classificam-se em três tipos: A, B e C. O tipo A é responsável pela fagocitose; o tipo B pela produção e excreção de proteínas, AH, entre outras moléculas do líquido sinovial; e o tipo C é uma forma transitória entre os tipos A e B<sup>1</sup>.

### **1.3.4 Líquido sinovial**

O líquido sinovial é responsável pela lubrificação articular, crucial para a integridade da articulação. Macroscopicamente, o líquido sinovial apresenta cor amarelada, consistência viscosa devido ao elevado teor em AH, e celularidade limitada essencialmente composta por linfócitos e macrófagos<sup>1</sup>.

Frequentemente considerado um ultrafiltrado do plasma sanguíneo. Ou seja, a troca rápida e relativamente fácil entre o sangue e a cavidade sinovial, permitem o movimento livre das macromoléculas e conseqüentemente, o suprimento eficiente dos nutrientes e a remoção de metabolitos e de outros produtos de excreção provenientes do metabolismo da cartilagem. Isto ocorre através das diferenças de pressão hidrostática e de pressão osmótica colóide entre o plasma e o líquido sinovial<sup>1</sup>.

## **1.4 Fisiologia e biomecânica da articulação**

Uma articulação saudável implica a manutenção da homeostasia articular, ou seja, o equilíbrio entre os processos de anabolismo (síntese e reparação) e catabolismo (degradação) - *turnover*. Contudo, as taxas de *turnover* de cada um dos componentes da

MEC são longas e variadas entre si<sup>1</sup>. Em concreto, a taxa de *turnover* das fibrilas de colagénio tipo II é extremamente demorada, sobretudo em adultos (cerca de 350 anos na cartilagem de um adulto humano<sup>3</sup>), o que em caso de lesão articular, prejudica substancialmente a capacidade de cicatrização das mesmas<sup>1</sup>. Todavia, o *turnover* da MEC implica um balanço entre fatores de crescimento, citoquinas e as cargas dinâmicas presentes no ambiente articular. Numa situação fisiológica em que existem citoquinas e fatores de crescimento benéficos, é o estímulo mecânico que influencia diretamente a homeostase<sup>1</sup>. Os fatores de crescimento anabólicos presentes na CA são o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento tipo insulina (IGF-1), ambos envolvidos na síntese da cartilagem<sup>3</sup>. Em oposição, as citoquinas com atividade catabólica incluem o fator de necrose de tumores- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 (IL-1), a principal citoquina envolvida no desenvolvimento de OA<sup>1</sup>.

Note-se que a sobrecarga articular provoca alterações nos condrócitos direta e indiretamente. Diretamente, a carga articular induz deformações nas células, o que desencadeia uma resposta celular. Secundariamente, altera a dinâmica do líquido sinovial devido às mudanças das pressões hidrostática e osmótica e ainda, a viscosidade do mesmo, que diminui em paralelo com o aumento do movimento articular (tixotropia)<sup>3</sup>.

#### 1.4.1 Lubrificação articular

Existem dois tipos de mecanismos envolvidos na lubrificação articular, o *boundary lubrication* e o *fluid film lubrication*<sup>8</sup>. O *boundary lubrication* é caracterizado pelo contacto direto entre as superfícies articulares onde atuam substâncias lubrificantes específicas tais como o AH e a lubricina, que conferem viscosidade ao líquido sinovial, protegendo a cartilagem do desgaste excessivo e da erosão<sup>8</sup>. Contudo, a concentração destes agentes lubrificantes pode estar reduzida em doenças articulares<sup>1,9</sup>. Por outro lado, o *fluid film lubrication* é um tipo de lubrificação acessória presente em movimentos de maior velocidade e com cargas superiores, baseado na exsudação de líquido intersticial sob pressão através da MEC, resistindo à compressão articular<sup>8</sup>. Os dois atuam sinergeticamente para assegurar a correta biomecânica articular. No entanto, qualquer disrupção nestes mecanismos, não só aumenta a fricção entre as superfícies articulares, como acomete também a integridade da cartilagem, contribuindo para o desenvolvimento de doença articular degenerativa<sup>10</sup>.

### 1.4.2 Mecanismo de percepção de dor

A percepção do estímulo doloroso através das fibras nervosas aferentes é mediada por neuropéptidos presentes nas terminações nervosas periféricas do osso subcondral, do periósteo marginal, da membrana sinovial e da cápsula articular. No grupo dos neuropéptidos estão incluídos a substância P, somatostatina, polipéptido vasoativo intestinal, entre outros. Os estímulos mecânicos desencadeiam uma resposta inflamatória pelos neuropéptidos com libertação de mediadores endógenos como as citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico, envolvidas nos mecanismos de percepção da dor<sup>1</sup> (Figura 4).

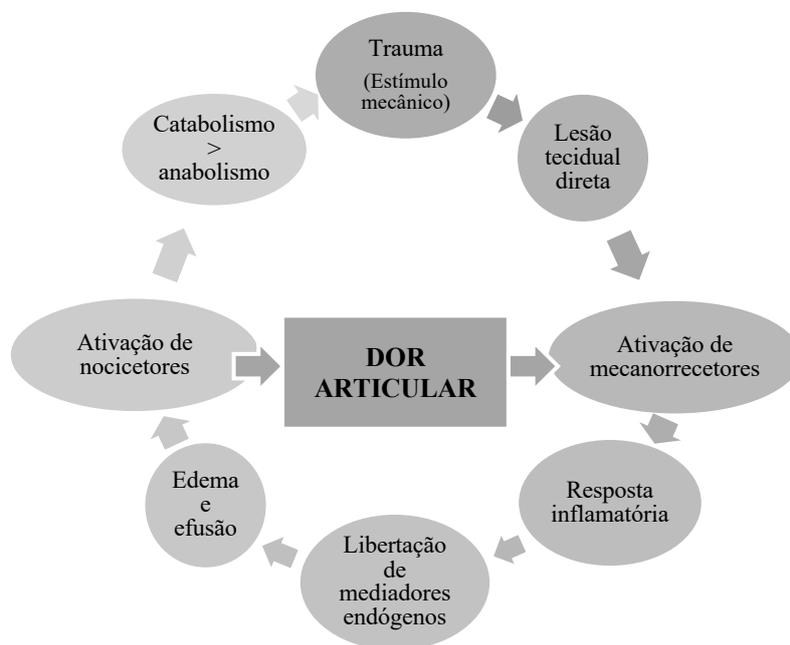


Figura 4 - Diagrama simplificado do ciclo vicioso da lesão osteocondral e degradação da MEC que contribuem para a dor associada à OA. (Adaptado de <sup>1</sup>)

## 2. Osteoartrite (doença articular degenerativa)

A OA é uma doença caracterizada pela degeneração progressiva da cartilagem articular acompanhada por alterações ósseas e dos tecidos moles periarticulares<sup>11</sup>.

Com efeito, a OA é uma das doenças mais prevalentes e debilitantes quer no ser humano, quer nos equinos. Afeta negativamente a performance desportiva dos cavalos atletas pois, cerca de 60% das claudicações manifestadas estão relacionadas com a OA, o que se reflete no significativo impacto económico negativo sobre os respetivos proprietários<sup>12</sup>.

## 2.1 Fatores de risco

São inúmeros os fatores predisponentes para o desenvolvimento de OA, nomeadamente: trauma direto e stress mecânico; restrição exagerada do movimento ou imobilização prolongada; conformação corporal e aprumos; obesidade; ferração inapropriada; e idade do animal<sup>13</sup>.

### a) Trauma/Stress mecânico:

Considerado uma causa primária do desenvolvimento de OA. Pode surgir em consequência de exercícios extenuantes de elevada intensidade que aplicam carga excessiva sobre as articulações e logicamente, provocam lesões por uso e desgaste da CA; fadiga cíclica ou crónica (originam frequentes lesões no osso subcondral<sup>14</sup>) ou derivado de uma conformação ou ferrações inadequadas<sup>13</sup>. A maioria das claudicações diagnosticadas em cavalos ocorrem nos membros anteriores, já que estes suportam cerca de 60-65% do peso total do animal e absorvem as forças resultantes da fase de impacto no solo, comparativamente aos membros posteriores, com função maioritariamente propulsiva. Estudos anteriores indicam que a articulação metacarpo-falângica (MCF) apresenta o maior número de lesões degenerativas e traumáticas em cavalos de corrida<sup>13</sup>.

### b) Restrição exagerada do movimento ou imobilização prolongada:

Enquanto que forças aplicadas em excesso conduzem à perda da CA, a ausência de estimulação mecânica em virtude da falta de exercício conduz à atrofia e degeneração da CA. Estudos realizados em diferentes espécies, demonstraram uma depleção do conteúdo de PGs e uma acumulação significativa de água em articulações imobilizadas, contrariamente às articulações exercitadas<sup>13</sup>.

### c) Conformação, aprumos e obesidade:

A conformação corporal diz respeito à silhueta externa do animal ditada primariamente pelo sistema músculo-esquelético, já os aprumos são definidos como a posição vertical dos membros. Neste sentido, determinadas conformações e aprumos como os “joelhos de boi”, *valgus* ou *varus* do carpo, provocam desequilíbrios angulares e mecânicos, potenciando o risco de desenvolvimento de OA<sup>13</sup>. Em animais obesos, é recomendável uma dieta apropriada para perder peso para minimizar o risco de doença<sup>15</sup>.

d) Ferração:

Uma correta ferração implica a manutenção do ângulo natural e o respetivo equilíbrio e configuração do casco a fim de garantir a absorção das forças mecânicas aplicadas quer no apoio em estação, quer na locomoção. Em oposição, uma ferração inadequada altera a pressão intra-articular na área de contacto entre as superfícies e consequentemente, favorece o desenvolvimento de doença articular degenerativa. A característica “pinça longa” ou “talões baixos” pode acentuar lesões por hiperextensão nas articulações do carpo e na MCF e ainda, causar lesões diretamente na articulação inter-falângica distal (IFD)<sup>13</sup>.

e) Idade do animal:

No homem, a idade avançada é o fator de risco mais significativo no desenvolvimento da OA. Contudo, nos cavalos pode surgir precocemente aos dois anos de idade. De facto, o treino destes animais numa fase precoce de crescimento pode antecipar lesões articulares decorrentes de exercícios de alta intensidade, bem como acelerar alterações relacionadas com a idade. Por outro lado, em animais mais velhos, as lesões de OA são frequentemente encontradas em locais específicos das articulações, sendo estas tendencialmente mais severas (exemplo: esclerose do osso subcondral). Note-se que, independentemente da idade, alguns cavalos apresentam predisposição genética para o desenvolvimento da OA<sup>13</sup>.

## **2.2 Etiopatogenia**

O mecanismo envolvido no desenvolvimento de OA implica a quebra da homeostase articular e por consequência, o desequilíbrio metabólico dos condrócitos em que o catabolismo predomina sobre o anabolismo em conjunto com o processo inflamatório, presente desde as fases mais precoces da doença<sup>13,16</sup> (Figura 5<sup>17</sup>).

Apesar de a OA ser frequentemente caracterizada pela presença de degradação da CA<sup>3</sup>, a doença degenerativa articular não afeta somente a cartilagem, mas pelo contrário, pode afetar qualquer outra estrutura que compõe a articulação. Pode ser provocada por traumas diretos/agudos, traumas repetitivos/fadiga cíclica (de carácter mais insidioso), tanto na membrana sinovial e na cápsula articular, induzindo capsulites e sinovites; como na CA e no osso subcondral, com vários graus de perda de CA (exemplo: ulcerações e

fibrilações da cartilagem, fraturas intra-articulares), esclerose subcondral, entre outros; e ainda através de lesões em estruturas periarticulares, como lesões nos meniscos ou nos ligamentos<sup>3</sup>. A literatura evidenciou a importância do carácter hereditário e das mutações genéticas na patogenia de OA. Isto é, mutações em moléculas da MEC (exemplo: condrodismplasias), defeitos mais ou menos insidiosos que promovem um alinhamento prejudicial e, logicamente, uma maior susceptibilidade a lesões, contribuindo para o seu aparecimento<sup>18</sup>.

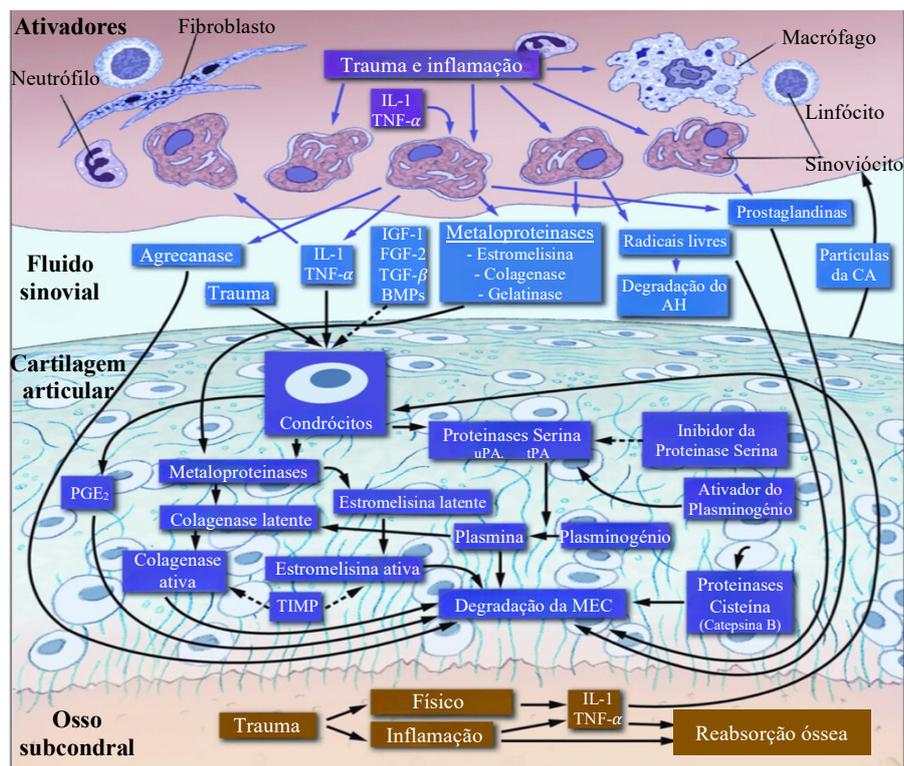


Figura 5 - Representação esquemática dos fatores envolvidos na degradação enzimática da MEC. \*BMPs\* – proteínas morfogenéticas do osso. (Adaptado de<sup>17</sup>)

### 2.2.1 Metaloproteínases (MPs)

As metaloproteínases (MPs) constituem um grupo de peptidases dependentes de zinco envolvidas no *turnover* fisiológico de todos os componentes da MEC, embora, em caso de OA, possam provocar a degradação excessiva dos seus componentes, possuindo um papel pivô na evolução da doença<sup>13,19</sup>.

Estas organizam-se em três subgrupos: as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e as colagenases, responsáveis por degradar a rede de colagénio, sendo a colagenase 3 (designada também por MMP-13), a principal colagenase envolvida na patogenia da

OA<sup>19</sup>; e as estromelinas (MMP-3 ou proteoglicanase) que possuem uma extensa variedade de substratos, atuando na clivagem de proteoglicanos e de vários tipos de colagénio, inclusive o colagénio tipo II<sup>3</sup>. Em adição, as agrecanases (ADAMTS-4 e ADAMTS-5) são um tipo de proteases derivadas das MPs envolvidas na degradação de proteoglicanos, sendo o *agrecan* o seu principal substrato<sup>20</sup>.

A produção e a atividade das MPs é regulada pela IL-1 que se liga através dos seus recetores aos condrócitos, regulando a transcrição de fatores que por sua vez, vão promover a conversão das proenzimas na forma ativa de MPs<sup>18</sup>. Por outro lado, a inibição destas enzimas está a encargo de dois tecidos inibidores, TIMP-1 e TIMP-2. É o equilíbrio entre a atividade das MPs e dos TIMP que previne a degradação da CA<sup>18</sup>.

### **2.2.2 Prostaglandinas E<sub>2</sub>**

A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é a principal prostaglandina envolvida na inflamação sinovial e na degradação da MEC em cavalos com OA. Mediante o controlo da IL-1 e do TNF- $\alpha$ , as enzimas ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina E sintetase produzem as prostaglandinas que, por sua vez, são libertadas pelos os condrócitos. As PGE<sub>2</sub> intervém no processo inflamatório através da vasodilatação, aumento da sensibilidade dolorosa, desmineralização óssea, inibição e degradação dos PGs e da estimulação da secreção de fatores ativadores de plasminogénio<sup>3,21</sup>.

### **2.2.3 Radicais livres de oxigénio**

No grupo dos radicais livres derivados de oxigénio estão incluídos o anião superóxido, o peróxido de hidrogénio, os radicais hidroxilo e o óxido nítrico (NO). Em caso de trauma mecânico ou doença articular degenerativa, há um aumento da concentração destes radicais no líquido sinovial e uma redução da função antioxidante, que potenciam a inflamação e agravam a lesão dos tecidos através da degradação de AH, colagénio e PGs. Em particular na OA, as concentrações elevadas do NO promovem a morte celular dos condrócitos e a degradação da MEC<sup>18</sup>.

### **2.2.4 Citoquinas**

Em sentido lato, as citoquinas são péptidos produzidos por uma célula cuja função é regular a atividade de outros tipos de células, tal como acontece no *turnover* fisiológico

da MEC. De igual modo, são responsáveis por exacerbar os mecanismos catabólicos que contribuem para a degradação da CA. De entre este grupo, a IL-1 e o TNF- $\alpha$  são as principais citocinas pro-inflamatórias envolvidas na patogénese da OA. Presentes em elevadas concentrações na membrana e líquido sinoviais, no osso subcondral e na CA, ambas modulam a síntese de MPs pelos condrócitos e pelas células sinoviais e induzem a libertação de outras citocinas. Em particular, a IL-1 estimula a atividade das MPs, agreganases e PGE<sub>2</sub> libertadas pelos condrócitos levando a supressão da expressão dos PGs e do colagénio tipo II. Embora o papel do TNF- $\alpha$  não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que este intervém na cascata inflamatória aumentando a morbidade e a dor<sup>3,16</sup>.

É por intermédio de recetores celulares específicos que as citocinas regulam e ativam outras células e é da mesma forma que estes mediadores podem ser inibidos. O recetor antagonista da IL-1 (IL-1Ra) é um inibidor natural com propriedades anti-inflamatórias produzido pelos condrócitos, fibroblastos sinoviais, entre outros tipos celulares, que atua por competição com outros recetores<sup>16</sup>. Estudos anteriores em cavalos, cães e coelhos demonstraram que o uso de terapias genéticas com IL-1Ra podia cessar a degradação da CA em casos de OA induzidas experimentalmente através da inibição da IL-1<sup>16,18</sup>.

### **2.2.5 Fatores de crescimento**

Os fatores de crescimento são péptidos biologicamente ativos com efeitos anabólicos e anti-catabólicos, reguladores da génese, metabolismo e diferenciação de condrócitos, contribuindo para a regeneração articular<sup>22</sup>. De entre eles, o TGF- $\beta$  e o IGF-1 são os principais fatores envolvidos na síntese dos componentes da MEC. O TGF- $\beta$  promove a expressão do colagénio tipo II e do *agrecan* e diminui a expressão das enzimas catabólicas. Em articulações saudáveis, apresenta-se em concentrações bastante reduzidas ou indetetáveis, o que difere substancialmente das articulações osteoartríticas, em que se apresenta com elevadas concentrações<sup>22</sup>. Contudo, o seu efeito diminui com a idade. O IGF-1 apresenta um papel anabólico fundamental na homeostasia articular ao estimular a produção da MEC, protegendo a cartilagem dos efeitos deletérios da IL-1<sup>18</sup>.

### **2.2.6 A influência da doença primária do osso subcondral no desenvolvimento da OA**

A doença primária do osso subcondral pode contribuir para o aparecimento de doença articular degenerativa na medida em que, mudanças na sua arquitetura, composição e/ou propriedades mecânicas podem mediar alterações em toda a unidade articular. A esclerose subcondral reduz a capacidade de absorção de choques e a resistência à tração, aumentando o risco de falha articular particularmente sob stresses mecânicos repetitivos. Enquanto isso, as alterações ao nível da arquitetura, tais como as fissuras, microfraturas, espessamento, remodelação osteoclástica, necrose e linhas de fragmentação no osso favorecem a fragilidade e a dor (exemplo: erosão das camadas superficiais da CA, disrupção focal da camada calcificada)<sup>14,18</sup>.

Tal como as lesões no osso subcondral provocam a perda de suporte da articulação, também as citocinas inflamatórias libertadas a nível local pelo osso influenciam a integridade da cartilagem articular<sup>14</sup>.

### **2.2.7 Mecanismos de alteração morfológica da CA**

As sinovites e as capsulites agudas decorrentes de traumas cíclicos são o problema mais comum das articulações de alta mobilidade dos cavalos atletas e possuem um papel importante no processo degenerativo da CA e no posterior desenvolvimento de OA, embora, lesões nos restantes constituintes da unidade articular sejam também potenciais fatores para a sua ocorrência<sup>18</sup>. Em primeiro lugar, o processo agudo de sinovite inicia-se sobretudo com mudanças no ambiente biomecânico através da libertação de mediadores inflamatórios e enzimáticos (MPs, agrecanases, PGE<sub>2</sub>), embora sem comprometimento morfológico da cartilagem. Posteriormente, com a perda progressiva dos componentes da MEC (sinovite persistente), alterações na morfologia são inevitavelmente manifestadas (Figura 6 e Figura 7). Especificamente, observa-se a perda do suporte da cartilagem e efusão articular, seguidas de ulceração e fibrilação superficiais que podem evoluir para as camadas mais profundas, resultando na erosão de espessamento total da CA ou, em casos mais severos, na exposição do osso subcondral (sinovite e capsulites crónicas)<sup>17,18</sup>.

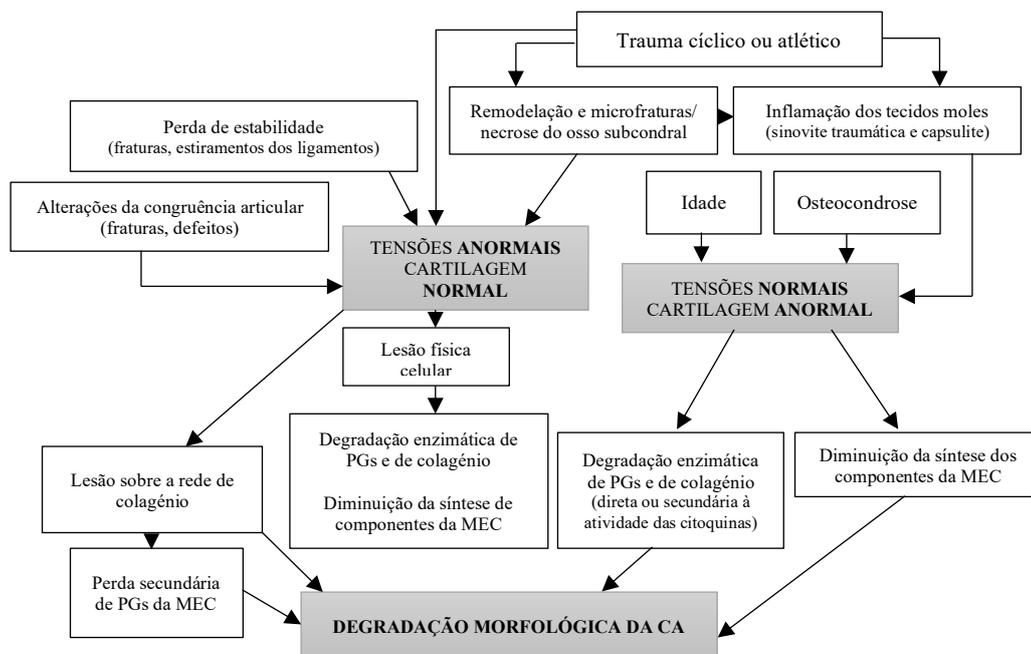


Figura 6 - Diagrama representativo das vias de degradação da cartilagem articular secundária a traumas em equinos. (Adaptado de <sup>17</sup>)

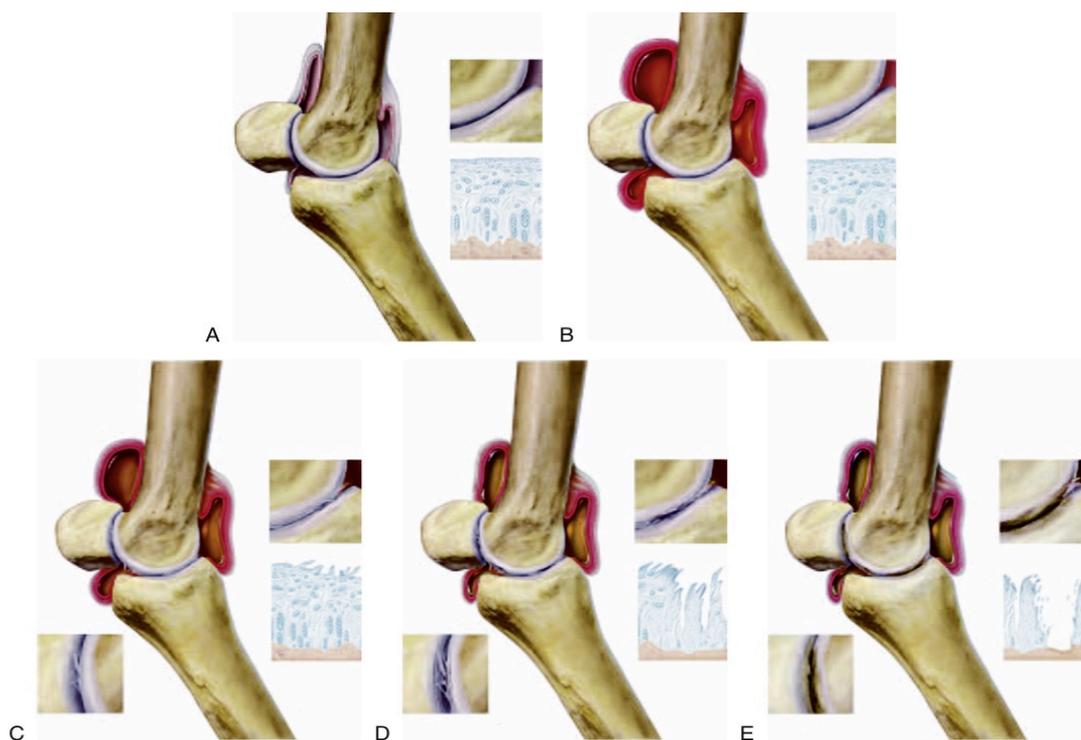


Figura 7 - Representação do desenvolvimento de OA na articulação do bolete secundária a trauma cíclico e sinovite e capsulite traumáticas. **A** – Articulação normal sem alterações da CA. **B** – Fase 1: Sinovite aguda sem alterações morfológicas da CA. **C** – Fase 2: Sinovite persistente e fibrilação precoce da CA. **D** – Fase 3: Sinovite e capsulite crónicas e fibrilação da CA que se estende até à camada profunda da CA. **E** – Fase 4: Erosões de espessura total da CA visíveis macro e microscopicamente. (Adaptado de <sup>18</sup>)

### 2.2.8 Mecanismos de reparação da cartilagem

A capacidade limitada da CA para executar uma reparação natural em resposta a uma lesão deve-se em parte, à sua estrutura desprovida de nervos e de vasos e, por outro lado, à reduzida capacidade mitótica dos condrócitos. De facto, constitui um fator limitante para o tratamento da doença articular degenerativa<sup>23</sup>.

Existem três mecanismos de reparação natural: a reparação intrínseca que se restringe à reduzida capacidade mitótica dos condrócitos e ao aumento pouco significativo do teor em PGs e colagénio; a reparação extrínseca que se baseia na atividade de células mesenquimatosas provenientes do osso subcondral para formar tecido conjuntivo, que pode eventualmente ser substituído por constituintes de cartilagem (metaplasia); e por último, o fluxo de matriz, que consiste no movimento da cartilagem desde a periferia para o centro do defeito<sup>18</sup>. A profundidade do defeito (espessura parcial ou total), o respetivo tamanho, localização e relação com áreas de maior ou menor impacto e ainda, a idade do animal influenciam a resposta da CA<sup>18</sup>.

Para mitigar o desenvolvimento da OA e a conseqüente perda de função articular, estratégias celulares coadjuvantes do processo de reparação da CA têm sido investigadas, tais como o recrutamento de células endógenas através do desbridamento e de microfraturas criadas cirurgicamente, implantação de condrócitos autólogos, entre outros<sup>23</sup>.

### 2.3 Sinais clínicos

A OA é uma doença de caráter insidioso e intermitente por excelência. Ou seja, os cavalos podem apresentar uma locomoção aparentemente “normal” (claudicação ausente) por longos períodos de tempo e, mais tarde, com a cumulativa sobrecarga mecânica e conseqüentes lesões na cartilagem, tornam-se sintomáticos<sup>11</sup>. Podem apresentar claudicação em graus variados, mais evidente no piso duro que melhora com o trabalho<sup>24</sup>. Adicionalmente, podem manifestar dor, aumento da temperatura da região, efusão articular, edema dos tecidos periarticulares e resposta positiva à flexão, sendo sinais que tendem a melhorar com o tempo<sup>5,25,26</sup>. A presença de dor frequentemente intermitente é a característica mais relevante e a causa mais comum de claudicação associada à OA<sup>26</sup>. Deste modo, tendo em consideração o facto de a CA ser desprovida de nervos, as lesões degenerativas resultantes podem ser significativamente severas antes da

dor ser percebida pelo animal. Além da dor, a diminuição da amplitude de movimento da articulação afetada é outra característica consistentemente encontrada tanto em animais mais jovens, como em animais geriátricos e, que pelo contrário, se torna mais severa com o tempo. Esta manifestação clínica ocorre em consequência da dor, efusão sinovial e edema em animais em fases agudas da OA, enquanto que em cavalos cronicamente afetados, ocorre devido à progressiva fibrose periarticular e da cápsula articular, mas também da presença de osteófitos marginais<sup>2,11</sup>. Por outro lado, as características imagiológicas mais frequentes são a presença de osteófitos, o aumento da radio-densidade do osso subcondral, com lise e quistos ocasionais e a diminuição do espaço articular<sup>25</sup> (Figura 8<sup>27</sup>).



*Figura 8 - Radiografia em projeção Dorsolateral-Palmaromedial Oblíqua (DLPMO) da articulação do boleto. Osteófito marginal no aspecto dorsomedial da falange proximal (P1) (seta longa). Formação irregular de osso na porção distal do metacarpiano III (seta pequena). Edema dos tecidos moles secundário a efusão articular (quadrado). (Adaptado de <sup>27</sup>)*

## 2.4 Diagnóstico

### 2.4.1 Exame locomotor

Um exame locomotor completo permite discernir as causas que estão na origem da claudicação nos cavalos e deste modo, delimitar as diretrizes para o tratamento adequado e o respetivo prognóstico. Em primeiro lugar, a história médica do animal deve ser detalhada, com o intuito de serem obtidas informações específicas relativas à idade

do animal e ao tipo de trabalho que executa e, que permitem ao médico veterinário, determinar as potenciais origens da claudicação. Além disso, os proprietários devem ser questionados quanto à duração e intensidade da claudicação, aos sinais clínicos, às atividades que precederam a claudicação e a eventuais tratamentos anteriores<sup>28</sup>.

O exame estático consiste na avaliação visual à distância e próxima do animal, seguida de uma palpação pormenorizada do sistema músculo-esquelético para identificar possíveis pontos de dor, aumentos de temperatura locais, assimetrias, atrofias, efusões, aprumos e conformações que favorecem o desequilíbrio do animal<sup>29</sup>. O exame dinâmico consiste na observação do animal em movimento à distância, primeiramente a passo e trote em linha reta e depois, em círculos, seguida da realização de testes de flexão. O objetivo deste exame é identificar o(s) membro(s) envolvido(s), o grau de claudicação (sistema de classificação da AAEP – Tabela 1) e/ou a incoordenação no movimento. Para localizar a região que está na origem da claudicação, podem ser realizadas anestésias perineurais ou intra-articulares. Por fim, deve ser realizado um diagnóstico imagiológico para confirmar a causa específica<sup>28</sup>.

*Tabela 1 - Sistema de classificação de claudicação AAEP. (Adaptado de <sup>29</sup>)*

GRAU	DESCRIÇÃO DA CLAUDICAÇÃO
0	Claudicação <u>ausente</u> .
1	Claudicação <u>difícilmente observada e inconsistente</u> ; notória somente perante algumas circunstâncias (exemplo: piso duro, círculos, entre outros).
2	Claudicação difícilmente observada a passo ou a trote em linha reta, mas consistente em <u>determinadas circunstâncias do trote</u> (exemplo: piso duro, círculos, entre outros).
3	Claudicação observada a trote perante <u>todas</u> as circunstâncias <u>do trote</u> .
4	Claudicação <u>óbvia</u> : movimento marcado da cabeça, redução das fases do movimento <u>a passo</u> .
5	<u>Supressão de apoio parcial ou total</u> : incapacidade de movimento.

### 2.4.2 Radiografia

É o meio complementar de diagnóstico *standard* utilizado para caracterizar as lesões e avaliar a evolução da doença articular degenerativa. Devido ao seu fácil acesso, facilidade e segurança relativas e por ser um método mais económico, os médicos veterinários utilizam-no frequentemente na sua rotina, após localizarem a região afetada com o intuito de identificarem alterações que confirmem o diagnóstico de OA. Contudo, esta técnica é pouco sensível para identificar lesões ósseas incipientes ou focais e lesões nos tecidos moles como é o caso da CA, que só é notória quando há uma extensa degradação da mesma, o que limita o seu uso como ferramenta de diagnóstico em fases iniciais ou muito subtis de OA<sup>2,5,30</sup>.

A imagem radiográfica como reflexo da OA numa fase mais precoce pode apresentar-se com redução do espaço articular, esclerose do osso subcondral (aumento da radiopacidade) (comparar Figura 9 e Figura 10<sup>31</sup>) e osteófitos marginais<sup>2</sup>. Em fases mais avançadas pode manifestar-se através de lise do osso subcondral (Figura 10), fragmentação osteocondral e anquilose articular. Porém, existe uma fraca correlação entre o grau de claudicação e a severidade das alterações radiológicas encontradas. Isto é, um animal pode apresentar lesões avançadas de degeneração articular que não se traduzem em graus superiores de claudicação<sup>2</sup>.



Figura 9 - Radiografia em projeção Dorso-Palmar (DP) com as variações anatómicas normais entre as articulações MCF, IFP e IFD. (Adaptado de <sup>31</sup>)



Figura 10 - Radiografia em projeção DP com redução do espaço articular do aspecto medial da articulação IFP (seta) e acentuada esclerose óssea; irregularidade do osso subcondral e lise do aspecto lateral da articulação; remodelação periarticular medial e lateral. (Adaptado de <sup>31</sup>)

### 2.4.3 Ultrassonografia

A ultrassonografia representa uma ferramenta de diagnóstico complementar ao exame radiográfico para a avaliação da doença articular, pois possui uma sensibilidade superior para detectar alterações nos tecidos moles periarticulares, inclusive a CA, cápsula articular, ligamentos, meniscos, entre outros; identificar e localizar acumulações de líquido sinovial ou de outros fluidos, bem como detectar precocemente irregularidades osteocondrais não visíveis à radiografia numa fase mais precoce da doença (Figura 11<sup>32</sup>). O Doppler fornece informação adicional relativa ao aumento da vascularização na membrana sinovial e na cápsula articular, que se traduz na inflamação destes tecidos, comum em fases iniciais da doença<sup>5</sup>. Por outro lado, a ecografia possui algumas limitações que restringem o seu uso em articulações cuja anatomia impede a passagem de certos ultrassons (“pontos cegos”), mas também em articulações envolvidas por enormes volumes de tecido<sup>2</sup>.



Figura 11 - Ultrassonografia de sinovite aguda da articulação do tornozelo. (A) - Plano transversal, região dorsal: Recesso dorsal preenchido com líquido anecogénico deslocando dorsalmente a cápsula articular e o tendão extensor comum (seta vermelha dupla). Interface da cartilagem é visível (setas amarelas). (B) – Plano sagital, região dorsal: membrana sinovial hipocogénica e crista sinovial nítida e triangular (seta amarela). (C) – Plano parasagital, região dorso-medial: em casos severos, os vasos da cápsula são notórios (setas) e a sinóvia apresenta um padrão heterogéneo secundariamente ao edema. (Adaptado de <sup>32</sup>)

Uma ecografia sugestiva de OA pode apresentar diminuição da espessura da cartilagem, irregularidades do contorno articular, alterações da ecogenicidade e ainda alterações no tecido ósseo (Figura 12<sup>33</sup>), nomeadamente osteófitos marginais (Figura 13<sup>32</sup>), entesófitos (Figura 13<sup>32</sup>), fragmentos osteocondrais e irregularidades no osso subcondral<sup>2</sup>.

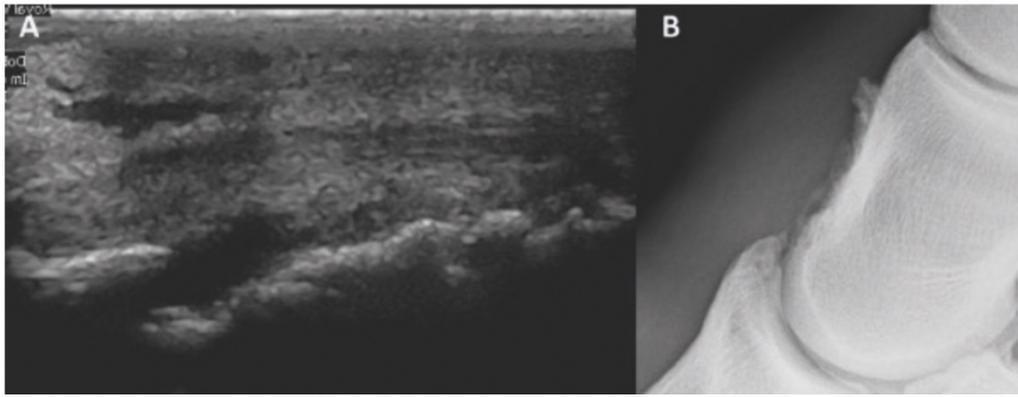


Figura 12 - OA da articulação IFD com formação de novo osso na superfície dorsal da segunda falange (P2). (A) - Ultrassonografia longitudinal dorsal. (B) - Radiografia em projeção Latero-Medial (LM) (Adaptado de <sup>33</sup>)

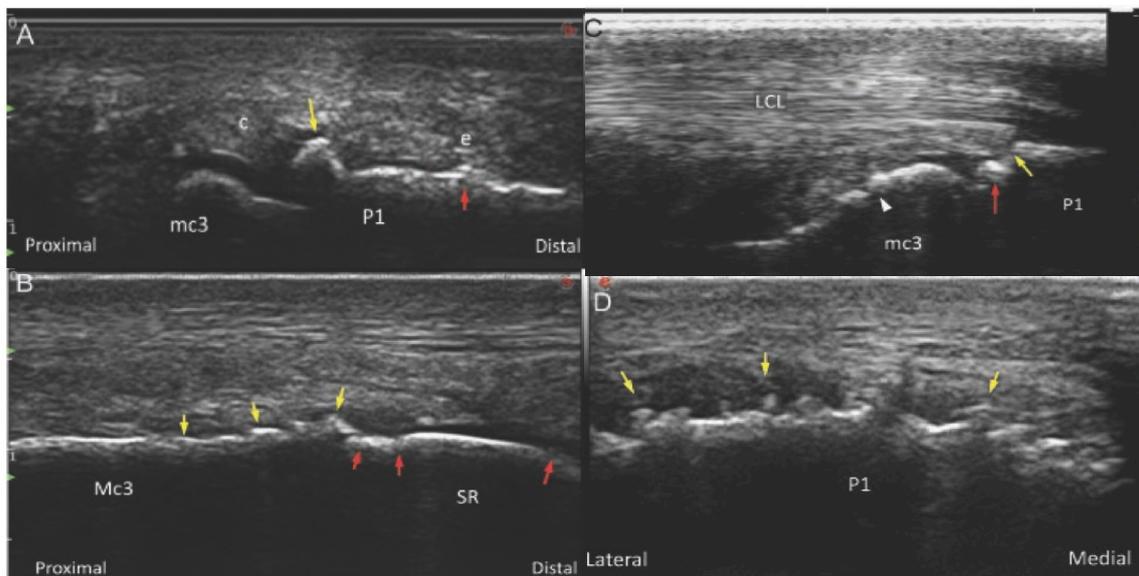


Figura 13 - Ultrassonografia de várias localizações e formações dos osteófitos. (A) – Exostose (*seta amarela*) no bordo dorso-medio-proximal da P1. Notar o espessamento da cápsula (*e*) e a remodelação óssea (*seta vermelha*) na inserção capsular da P1 (*e*). (B) – Remodelação óssea com padrão irregular e difuso (*setas amarelas*) no aspeto dorso-proximal da crista sagital (SR), com erosões focais e áreas hiperecogénicas de cartilagem hialina (*setas vermelhas*). (C) – Osteófito no bordo lateral articular da P1 (*seta vermelha*). Notar que o osteófito é contínuo com a superfície articular da P1, axial e proximal à inserção do ligamento colateral. Este diferencia-se do entesófito na inserção do ramo profundo do ligamento (*seta amarela*). Osteófito difuso e irregular no bordo abaxial do côndilo do metacarpiano III (*seta branca*). (D) – OA severa com extensa remodelação óssea nas margens articulares da P1. (Adaptado de <sup>32</sup>)

#### 2.4.4 Ressonância Magnética

A ressonância magnética é um método de diagnóstico não invasivo que permite obter um exame anatómico detalhado quer dos tecidos ósseos, quer dos tecidos moles e ainda, obter informações fisiológicas (Figura 14<sup>31</sup>). Consiste na absorção de energia pelos prótons de hidrogénio, abundantes na gordura e na água dos tecidos, que, quando sujeitos

a um campo eletromagnético pulsado específico, alteram a sua orientação<sup>34</sup>. Quando o campo magnético cessa, os prótons retornam à sua posição original, enquanto é emitido um sinal de ressonância cuja intensidade é variável consoante o tipo de tecido, permitindo obter diferentes imagens cortadas em vários planos tridimensionais<sup>34,35</sup>. Esta técnica de alta resolução permite a avaliação direta de todos os constituintes articulares inclusive a morfologia, volume e composição da CA através da aplicação de contrastes que aumentam a sensibilidade do diagnóstico e do desenvolvimento de técnicas quantitativas<sup>5</sup>. Assim, este aparelho é altamente vantajoso para a discriminação da perda de CA em pacientes com OA, embora o seu uso seja limitado devido ao seu elevado custo e à disponibilidade restrita do equipamento<sup>2</sup>.

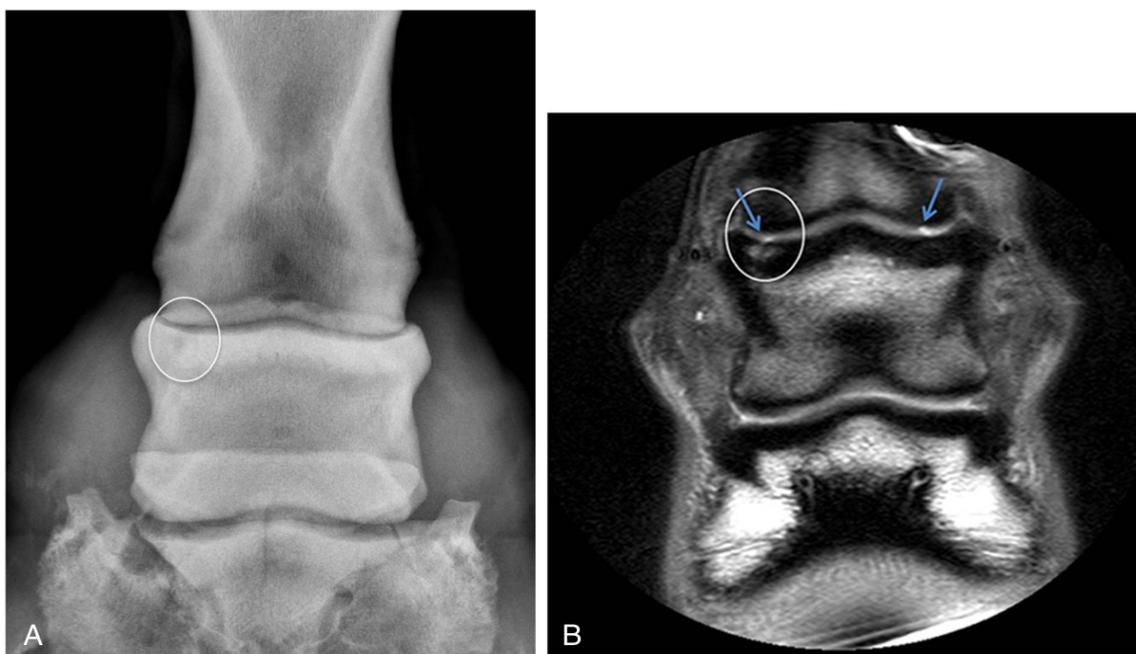


Figura 14 - (A) - Radiografia em projeção DP 30° da articulação IFP. Lucência focal com esclerose óssea subcondral no aspeto medial proximal da P2 (círculo). (B) – Ressonância magnética correspondente em plano dorsal. As lesões quísticas do osso subcondral e os defeitos da cartilagem presentes nos aspetos medial e lateral da IFP (setas azuis). (Adaptado de <sup>31</sup>)

#### 2.4.5 Cintigrafia nuclear

A cintigrafia nuclear é um meio de diagnóstico que se baseia na distribuição fisiológica de um radioisótopo no organismo, avaliando indiretamente o metabolismo ósseo. A técnica consiste na administração endovenosa de radiofármacos que na sua composição possuem um radioisótopo (normalmente o tecnécio-99m – <sup>99m</sup>Tc) associado

a um fármaco. Este, por sua vez, liga-se a um determinado tecido e permite a detecção do radioisótopo no organismo. No caso específico de OA, são os bifosfonatos que se ligam aos cristais de hidroxiapatite do osso. Cerca de três a quatro horas depois, é realizado um varrimento do animal com uma câmara movida em diferentes direções e que deteta os raios gama emitidos pelos radiofármacos. Todavia, é uma técnica com fraca resolução dada a reduzida emissão de raios gama pelos radioisótopos e com baixa especificidade pois, o metabolismo ósseo aumenta em resposta a qualquer fator agressor, independentemente da causa primária<sup>2,36</sup>.

A cintigrafia tem vindo a mostrar-se útil em casos em que existe claudicações subtis ou em vários membros e no diagnóstico precoce de doença articular, quando existe um metabolismo ósseo intenso em resposta ao fator agressor, mas ainda não são detetadas alterações radiográficas<sup>36</sup>. É de esperar, que lesões ósseas metabolicamente mais ativas possuam uma maior ligação de radioisótopos, como é o caso das articulações osteoartríticas<sup>2</sup> (Figura 15<sup>27</sup>).

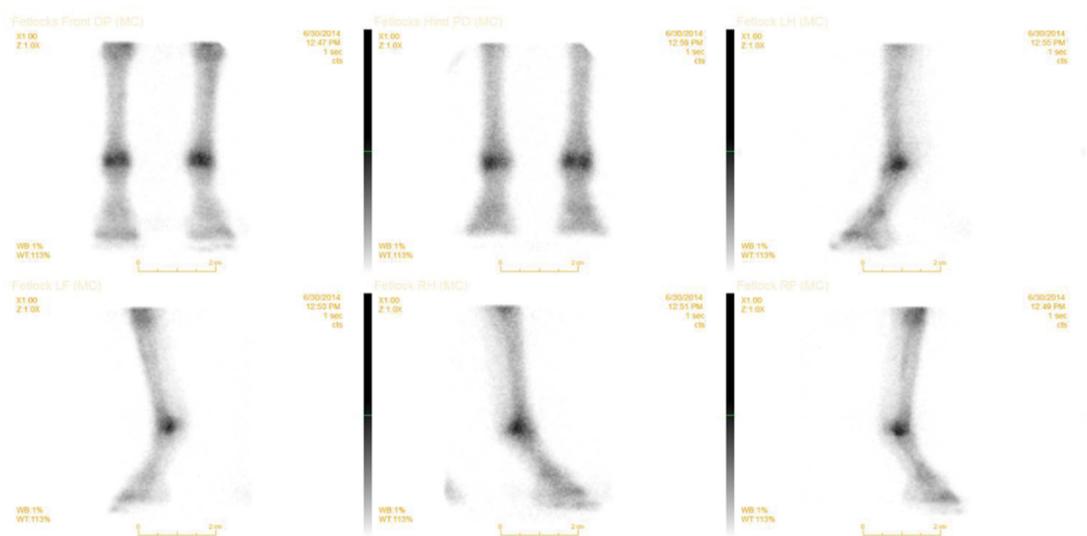


Figura 15 - Cintigrafia nuclear de quatro boletos (MCF e MTF) de um poldro com três anos de idade com claudicação bilateral dos membros posteriores que melhora com bloqueio metatarsico plantar lateral. Há um aumento da captação radio-farmacêutica na região dos côndilos palmares e plantares das quatro articulações do boleto. (Adaptado de <sup>27</sup>)

#### 2.4.6 Tomografia computadorizada

A tomografia computadorizada é um meio de diagnóstico de imagem avançada que se baseia no princípio de emissão de raios-X através de um emissor giratório em torno do paciente e a respetiva interação com os diferentes tecidos (diferenças de densidade), de

maneira a criar imagens transversais e tridimensionais detalhadas e não sobrepostas, contrariamente à radiografia<sup>37</sup> (Figura 16<sup>37</sup>). Possui uma maior especificidade para avaliar as estruturas ósseas, sendo bastante útil para detetar reações de remodelação e de osteólise ou linhas de fratura e fragmentos muito ténues<sup>38</sup>. Em casos de doença articular degenerativa, esta técnica é benéfica uma vez que permite observar defeitos minuciosos de mineralização da CA e do osso subcondral, osteófitos marginais e reações de lise e de esclerose ósseas<sup>37,39</sup>. Todavia, é uma técnica cuja resolução para identificar tecidos moles é reduzida, implicando a adição de contrastes e cujo uso é limitado devido aos custos associados e à necessidade do equipamento<sup>5,37</sup>.

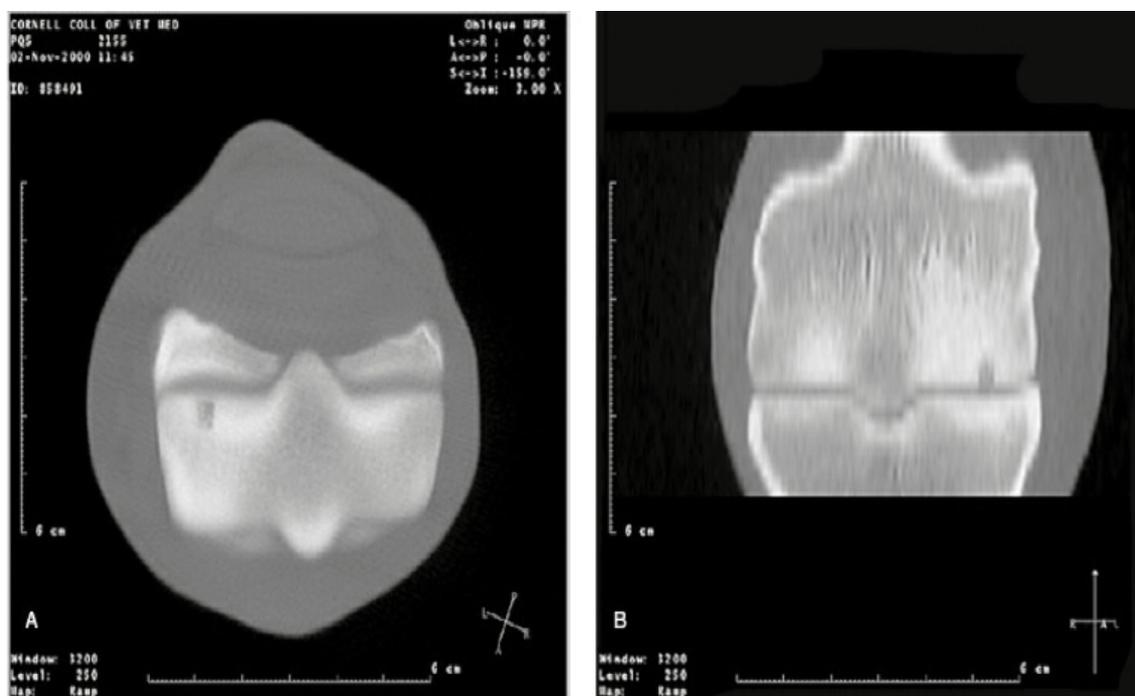


Figura 16 - Tomografia computadorizada em plano transversal da região distal do metacarpiano III. (A) – Lucência compatível com lesão quística subcondral associada a esclerose. (B) – Reconstrução multiplanar que evidencia a comunicação entre o quisto e a articulação MCF. (Adaptado de <sup>37</sup>)

#### 2.4.7 Artroscopia

A artroscopia é uma técnica cirúrgica invasiva, sendo considerada o meio de diagnóstico mais sensível e específico para a avaliação sinovial no cavalo<sup>40</sup>. Permite a observação direta de estruturas intra-articulares tais como ligamentos, meniscos, cápsula articular, membrana e líquido sinoviais<sup>41</sup>; permite obter informações relativas à integridade, espessamento e rigidez da CA e assim, classificar o grau de degradação da mesma, bem como averiguar se há exposição do osso subcondral<sup>5,41</sup> (Figura 17 e Figura

18<sup>25</sup>). Embora seja uma técnica bastante vantajosa, deve ser apenas indicada como meio de diagnóstico para a OA quando os meios convencionais e a resposta ao tratamento são ambos inconclusivos<sup>41,42</sup>.



Figura 17 - Artroscopias (A) - Aspeto medial da articulação inter-cárpica com erosão da CA e osteófito no osso carpal radial e menor degradação da cartilagem na superfície oposta do terceiro osso carpal. (B) - Articulação MCF com linhas de uso indicativas de fase precoce de OA. (Adaptado de <sup>25</sup>)

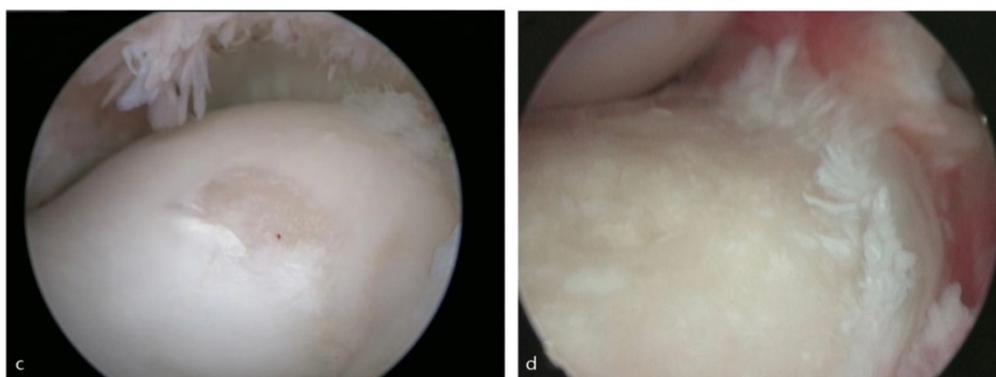


Figura 18 - Artroscopias (C) - Articulação MCF com erosão focal da CA no côndilo medial do metacarpiano III. (D) - Articulação inter-cárpica com erosão severa da CA no osso carpal radial. (Adaptado de <sup>25</sup>)

#### 2.4.8 Análise do líquido sinovial

O líquido sinovial em pacientes afetados com OA apresenta uma viscosidade mais reduzida, que pode ser justificada pela menor concentração de AH, particularmente comum em condições de sinovites ativas ou em artrites crônicas traumáticas. A determinação da concentração de AH no líquido sinovial não é uma prática de rotina em clínica devido, em parte, à sua elevada variabilidade entre animais, o que torna a sua interpretação questionável. Contudo, pode ser avaliada de forma indireta pela observação do aspeto e da viscosidade do líquido durante a artrocentese<sup>2</sup> (Figura 19<sup>43</sup>). Para além disto, em articulações osteoartíticas, os níveis de proteína, de mediadores inflamatórios

(em especial, a PGE<sub>2</sub>) e de determinados biomarcadores encontram-se significativamente elevados<sup>25,44</sup>.

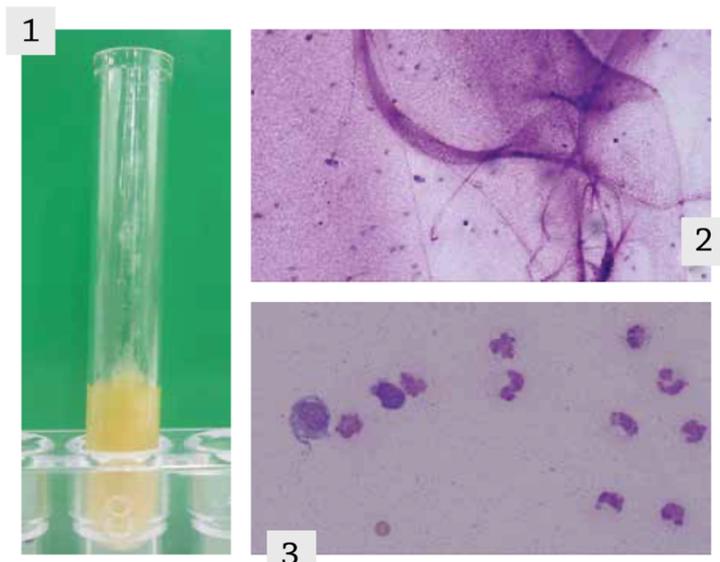


Figura 19 - Análise do líquido sinovial. (1) - Líquido sinovial com teor elevado em células nucleadas. (2) - Líquido sinovial com elevado teor em proteoglicanos. (3) - Artrite séptica. (Adaptado de <sup>43</sup>)

#### 2.4.9 Biomarcadores da OA

Os biomarcadores (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, COMP, GAG, HA, ADAMTS-5, entre outros) são os produtos resultantes do *turnover* tecidual presentes no líquido sinovial quer em cartilagens saudáveis, quer em cartilagens afetadas com doença articular e no osso<sup>45</sup>. Embora a OA seja diagnosticada pelos meios convencionais, a necessidade de um diagnóstico precoce, antes da presença de sinais radiográficos, tornou os biomarcadores uma ferramenta útil para estabelecer um diagnóstico precoce, avaliar a resposta ao tratamento e para estabelecer um prognóstico<sup>45</sup>. A sua utilidade foi comprovada por um estudo experimental realizado em equinos, em que as concentrações destes biomarcadores apresentaram um aumento significativo durante o decurso da OA. Além disso, o aumento dos seguintes biomarcadores IL-1, IL-6, MMP-9, MMP-13, COMP, GAG, HA, ADAMTS-5, CS 846, CTX-II (péptido C-terminal do colagénio tipo II) ocorreu antes dos sinais clínicos de claudicação serem notórios, o que fornece uma base teórica para o diagnóstico atempado da doença<sup>46</sup>.

## 2.5 Abordagem terapêutica à osteoartrite

Denote-se que não existe nenhum tratamento “ideal” para impedir o progresso da OA, nem para restaurar a homeostasia do ambiente articular<sup>5</sup>. Deste modo, a abordagem terapêutica deve assentar primariamente num diagnóstico atempado e coerente, associado a uma avaliação completa do paciente, para que as estruturas “alvo” de tratamento sejam identificadas e a escolha terapêutica seja adequada. Isto porque a escolha do tratamento é influenciada por diversos fatores. Entre eles salientam-se a presença de doenças sistêmicas concomitantes, historial de ulceração gastrointestinal ou de insuficiência renal derivadas da administração recorrente de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), resposta a tratamentos anteriores, expectativas para o cavalo e a abertura financeira do proprietário. De seguida, aplica-se uma abordagem multimodal que consiste em: medicação sistémica, terapia intra-articular (IA) convencional (exemplo: corticosteroides) ou biológica (exemplo: plasma rico em plaquetas), suplementação, reabilitação músculo-esquelética, planos de trabalho em superfícies adaptadas, e ainda controlo de peso do animal<sup>15</sup>.

### 2.5.1 Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)

Os AINEs são um grupo de fármacos com propriedades SMOAD (*symptom-modifying osteoarthritis drug*) que intervêm na cascata inflamatória ao inibir a atividade de compostos enzimáticos, em particular da ciclo-oxigenase, responsáveis pela conversão do ácido araquidónico em prostaglandinas e tromboxanos. Estes últimos são mediadores envolvidos na dor, na quebra da homeostasia e no processo inflamatório articular. Os AINEs são frequentemente usados em casos agudos, acompanhados por outros tratamentos coadjuvantes. São considerados os agentes preferenciais para o controlo da dor em cavalos com doença articular devido ao seu reduzido custo associado, eficácia, disponibilidade e facilidade de administração<sup>47</sup>.

De entre os mais usados, a fenilbutazona, inibidor não seletivo da COX, é considerada o agente mais usado e eficiente no tratamento sintomático das doenças músculo-esqueléticas. A sua dose de referência é 2,2-4,4mg/kg SID ou BID, podendo ser administrada por via oral (*per os*) ou intravenosa (IV). Com efeitos equiparáveis à fenilbutazona, a flunixinina-meglumina é outro fármaco comumente usado no tratamento de OA, também classificado como inibidor não seletivo da COX. A sua dose de referência

é 1,1mg/kg SID, podendo ser administrada por via oral ou IV. Ambos, se utilizados de forma prolongada, podem provocar ulceração gastrointestinal e insuficiência renal<sup>44</sup>. Por outro lado, o Firocoxib (dose de iniciação: 0,3mg/kg, *per os/IV*, SID; dose de manutenção: 0,1mg/kg, *per os/IV*, SID<sup>48</sup>) e o Meloxicam (0,6-0,8mg/kg, *per os/IV*, SID<sup>49</sup>), inibidores seletivos da COX-2, por “pouparem” os efeitos benéficos da COX-1 - manutenção das funções fisiológicas gastrointestinais -, são recomendados em pacientes com ulceração gastrointestinal e em casos em que a administração de AINEs é prolongada no tempo<sup>44</sup>. De acordo com Bookbinder et al. (2023), apesar da redução dos efeitos gastrointestinais adversos, os efeitos deletérios sobre a função renal demonstraram-se equivalentes aos provocados pelos fármacos não seletivos<sup>48</sup>.

### 2.5.2 Corticosteroides

Os corticosteroides são amplamente usados no tratamento da doença articular visto que são eficazes em combater a inflamação e apresentam um custo reduzido. Administrados por via intra-articular (IA) e cujo efeito é dose-dependente<sup>50</sup>, são fortes agentes anti-inflamatórios que intervêm em várias fases da cascata inflamatória – ação SMOAD<sup>15</sup>. De um modo geral, reduzem a vasodilatação, diapedese, fagocitose e acumulação de células inflamatórias e impedem a síntese e libertação de mediadores - IL-1 e TNF- $\alpha$ . O alívio sintomático e rápido da dor é feito à custa da inibição da fosfolipase A2 e da COX-2, impedindo a produção de prostaglandinas<sup>51</sup>. O aparecimento de *flares* (inflamação local) e de artropatias após injeção, infeções e de laminites são alguns exemplos de efeitos adversos decorrentes do seu uso<sup>52</sup>. Apresentam várias contraindicações no que concerne ao atraso da cicatrização em lesões agudas; à sua fácil difusão para tecidos moles periarticulares com o consequente aparecimento de lesões nestas estruturas (exemplo: desmopatias); e ao seu uso em animais com doença metabólica, aumentando o risco de laminites<sup>15</sup>. Quando são usados repetidamente (superior quatro vezes por ano) e em doses excessivas, potenciam a degradação da CA e a exposição do osso subcondral<sup>5,51</sup>.

O acetato de triancinolona (12mg/articulação, via IA<sup>53</sup>) é o corticosteroide mais usado em articulações móveis. Em particular, apresenta um tempo de ação intermédio, possui efeitos benéficos no controlo da dor e na redução da claudicação e ainda, efeitos condroprotetores – ação DMOAD (*disease modifying osteoarthritis drug*)<sup>15,51</sup>. O fosfato

de betametasona ( $\leq 30\text{mg}$  por cavalo (dose corporal total até duas articulações), via IA<sup>53</sup>) é outro dos fármacos frequentemente mais usados. Apresenta um início de ação mais rápido mas de duração mais curta e não possui efeitos condroprotetores, quando comparado à triancinolona<sup>15</sup>. O acetato de metilprednisolona ( $\leq 200\text{mg}$  por cavalo (dose corporal total até três articulações), via IA<sup>53</sup>) é um corticosteroide de tempo de ação e de detecção prolongados<sup>54</sup>, que deve ser reservado para articulações de reduzida mobilidade visto que possui efeitos deletérios para a integridade da CA, nomeadamente de degradação e de atraso da cicatrização da CA e de mineralização distrófica dos tecidos moles<sup>15</sup>. As doses e respetivos tempos de detecção destes corticosteroides podem ser consultados na tabela 2.

*Tabela 2 - Dosagem e tempos de detecção dos corticosteroides administrados por via IA. (Adaptado de <sup>53</sup>)*

<b>Corticosteroide</b>	<b>Dose</b>	<b>Tempo de detecção (doping)</b>
<b>Acetato de triancinolona</b>	12mg (1 articulação)	168 horas (7 dias)
<b>Acetato de metilprednisolona</b>	100 mg (2 articulações)	336 horas (14 dias)
	200mg (3 articulações)	672 horas (28 dias)
<b>Fosfato de betametasona</b>	30mg (dose corporal total até 2 articulações)	168 horas (7 dias)

### **2.5.3 Suplementação com ácido hialurónico (AH)**

O AH (10-50mg/articulação a cada sete dias e no máximo três administrações), constituinte principal do líquido sinovial, é administrado como viscosuplemento, isto é, como “veículo” do agente terapêutico, permitindo a sua libertação de forma gradual e em simultâneo, repondo a viscoelasticidade do líquido sinovial – ação SMOAD e DMOAD<sup>50</sup>. É usado no tratamento da doença articular com o intuito de proteger a articulação através da manutenção da função estrutural lubrificante, da promoção da secreção endógena de AH pelos sinoviócitos e da sua ação anti-inflamatória, ao minimizar a libertação de prostaglandinas, leucotrienos, citoquinas, radicais livres e a migração leucocitária<sup>55,56</sup>. Contudo, a eficácia do seu uso na OA é ainda controversa. Estudos anteriores demonstraram que a sua eficácia está relacionada diretamente com o peso molecular do AH (deverá ser igual ou superior a 500000 Daltons<sup>56</sup>), a via de administração e o número de injeções intra-articulares<sup>55</sup>.

O AH é usado no tratamento de sinovites ligeiras a moderadas relacionadas com OA, pelo que o seu uso em casos mais severos é bastante mais limitado<sup>5</sup>. Quando administrado sozinho, não é suficiente para reduzir significativamente o grau de claudicação e apresenta uma taxa de ocorrência de *flares* de 12%<sup>15</sup>. Deste modo, o AH tem sido frequentemente administrado em conjunto com corticosteroides, sendo o AH e o acetato de triancinolona, a combinação sinérgica mais usada na clínica para resultados a curto e a longo prazo<sup>56</sup>.

#### **2.5.4 Glicosaminoglicanos polissulfatados (PSGAG)**

Pertencentes ao grupo dos polissacáridos polissulfatados derivados da traqueia e do pulmão de bovino, os PSGAG possuem uma ação DMOAD e são usados no tratamento da OA a fim de prevenir e atrasar a degradação da CA. O principal GAG presente nos PSGAG é um análogo do sulfato de condroitina, o principal constituinte do *agrecan*<sup>57</sup>.

A administração intramuscular (IM) de PSGAG (500mg/articulação a cada quatro dias até concluir sete tratamentos<sup>58</sup>) é a abordagem terapêutica profilática mais comum em casos crónicos e pós-cirúrgicos, embora a sua eficácia permaneça indefinida<sup>59</sup>. Nesta perspetiva, pesquisas anteriores indicaram uma eficácia superior quando administrado por via IA (250mg/articulação a cada sete dias e no máximo cinco administrações)<sup>59</sup>. Segundo Frisbie et al. (2009), por via IA, há uma redução significativa da claudicação, da efusão sinovial, da vascularização e da fibrose da cápsula articular<sup>60</sup>. No entanto, o uso do agente terapêutico por IA está associado ao risco de infeção, pelo que a administração conjunta de amicacina IA (125mg/articulação) minimiza esse risco<sup>47</sup>.

#### **2.5.5 Formulação terapêutica: AH, sulfato de condroitina e N-acetil-D-glucosamina**

A combinação terapêutica entre AH, sulfato de condroitina e N-acetil-D-glucosamina (Poliglicano®) tem sido descrita no tratamento da OA. Embora existam várias formulações, um frasco de 5ml contém 25mg de AH, 500mg de sulfato de condroitina e 500mg de N-acetil-D-glucosamina. Recomenda-se a administração IA, embora esteja reportado o seu uso por via IV e IM, com eficácia questionável<sup>59</sup>. O estudo experimental *in vivo/ex vivo* em equinos de Frisbie et al. (2013) demonstrou que a sua administração IA resultou numa redução dos sinais clínicos de dor e do grau de

claudicação – propriedades SMOAD<sup>61</sup>. Além disso, houve uma tendência quer para a melhoria dos sinais radiográficos de remodelação óssea e para a atenuação das lesões de erosão da CA, quer para restabelecer os níveis de lubrificação articular – propriedades DMOAD<sup>61</sup>.

### **2.5.6 Polissulfato de pentosano (PPS)**

O polissulfato de pentosano (2-3mg/kg a cada semana durante quatro semanas, por via IM) é um polissacárido polissulfatado semi-sintético heparinóide derivado da hemicelulose da madeira da faia, capaz de modular o progresso da doença articular degenerativa<sup>62</sup>. Amplamente usado na Austrália, o seu uso está indicado em casos crônicos de OA e como uma abordagem preventiva<sup>63</sup>. Possui diferentes mecanismos de ação através dos quais inibe a atividade das MPs e de outros mediadores pró-inflamatórios; estimula a síntese de TIMPs, AH e de proteoglicanos; e tem efeitos anti-inflamatórios e fibrinolíticos<sup>62</sup> – propriedades essencialmente DMOAD<sup>63</sup>. De acordo com um modelo experimental de OA, houve uma diminuição significativa da fibrilação da CA e logo, uma melhoria dos seus aspetos histológicos. Por outro lado, verificou-se um aumento da concentração de sulfato de condroitina (SC 846) no líquido sinovial de articulações tratadas com PPS e não foram detetados efeitos adversos<sup>64</sup>.

De acordo com o que foi descrito por McIlwraith (2016), vários estudos confirmaram a eficácia superior do PPS relativamente aos PSGAG<sup>63</sup>.

### **2.5.7 Bifosfonatos (BPs)**

Os bifosfonatos são compostos orgânicos sintéticos não biodegradáveis constituídos por inúmeras ligações de carbono(C)-fósforo(P) na sua estrutura, através da qual se liga intimamente aos cristais de fosfato de cálcio do osso. O principal efeito dos BPs é reduzir a reabsorção óssea alterando o metabolismo do osso, todavia, são usados para tratar doenças degenerativas como a OA, devido ao seu efeito condroprotetor, analgésico, anti-inflamatório e anti-angiogénico – efeitos DMOAD e SMOAD. A sua capacidade anti-reabsortiva é mediada pelo bloqueio da atividade osteoclástica e pela sua afinidade ao fosfato de cálcio<sup>65</sup>. Em simultâneo, os BPs inibem a apoptose dos osteócitos e dos osteoblastos e estimulam a proliferação dos osteoblastos<sup>66</sup>. O efeito anabólico sobre os osteoblastos pode induzir alterações na geometria óssea, sobretudo na disposição espacial do osso cortical<sup>65</sup>.

Os BPs mais usados em medicina equina e enunciados por ordem decrescente de afinidade mineral são: tiludronato, pamidronato e zoledronato. O tiludronato (Tildren®) foi o primeiro BP a ser licenciado para o tratamento do esparavão ósseo e do síndrome do osso navicular, sendo atualmente o mais estudado e usado no tratamento de variadas condições ortopédicas em cavalos<sup>67</sup>. Atuam primariamente sobre os osteoclastos, provocando efeitos citotóxicos e a sua apoptose celular. Em resultado, o tiludronato atenua a remodelação óssea e promove a restauração do equilíbrio entre a formação e a reabsorção ósseas, mesmo durante períodos de imobilização prolongados<sup>67,68</sup>. Além disto, apresenta propriedades anti-inflamatórias ao reduzir a libertação de óxido nítrico e de citocinas pelos macrófagos e ao inibir a atividade das MPs e de citocinas, que regulam a secreção de enzimas catabólicas pelos condrócitos (exemplo: IL-1)<sup>65</sup>. Num estudo realizado em cavalos com esparavão ósseo, em associação com exercício controlado, o tiludronato permitiu reduzir o grau de claudicação. Esse mesmo estudo demonstrou que uma dose única administrada IV lenta de 1mg/kg foi bem tolerada pelos animais e não apresentou efeitos deletérios associados<sup>69</sup>.

Os efeitos clínicos destes agentes terapêuticos não são imediatos e podem demorar até dois meses para serem notórios. Contudo, o seu uso excessivo e/ou prolongado contribui para o aumento da fragilidade óssea, pelo que a sua utilização deve ser regradada e reservada para casos estritamente necessários. A administração de BPs está associada ao risco aumentado de doença renal e por vezes, sinais ligeiros e transientes de cólica podem ser notificados<sup>15</sup>. O juízo final relativo à aplicabilidade e eficácia dos BPs depende da escolha do BP, do efeito dose-dependente, do plano de tratamento, mas sobretudo da condição atual da doença<sup>65</sup>.

### **2.5.8 Dimetilsulfóxido (DMSO)**

O DMSO é um líquido solvente que embora não seja classificado como agente anti-inflamatório, possui propriedades antimicrobianas, analgésicas e anti-inflamatórias, sendo usado frequentemente em lavagens articulares como coadjuvante do tratamento de sinovites<sup>5</sup>. Segundo o estudo comparativo de lavagens articulares com e sem DMSO, nas lavagens em que se adicionou a solução de DMSO, verificou-se a redução do grau de claudicação, da contagem de células inflamatórias, de PGE<sub>2</sub> e de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 e IL-6)<sup>70</sup>.

### **2.5.9 Suplementação oral: Nutracêuticos**

O termo nutracêutico deriva das palavras “nutriente” e “farmacêutica”, sendo definido como alimentos ou partes de alimentos usados como suplementos orais com efeitos benéficos para a saúde e bem-estar animal. Porém, não apresentam regulamentações quanto ao seu uso, o que em parte, contribui para que a utilização de suplementos orais dietéticos tenha sido amplamente difundida na indústria equina. A eficácia e segurança dos nutracêuticos ainda permanece indefinida devido ao número limitado de estudos *in vivo* e *in vitro* descritos<sup>71</sup>.

Os suplementos orais articulares são os mais usados quer na Europa, quer nos Estados Unidos<sup>71</sup>. São formulados com ingredientes condroprotetores com o objetivo de tratar ou prevenir o desenvolvimento de doenças articulares degenerativas, com ações SMOAD e DMOAD. As formulações mais comuns aplicadas à OA contém sulfato de condroitina e glucosamina, embora possam conter outros ingredientes, tais como ácido hialurônico, vitaminas A, C, e E, minerais (exemplo: selênio, magnésio), ácidos gordos ômega EPA e DHA, e extratos vegetais, como o resveratrol e a mistura de abacate e soja insaponificáveis<sup>15,71</sup>.

### **2.5.10 Gel de poliacrilamida**

O gel de poliacrilamida é um componente 100% sintético, insolúvel e não imunogénico, com propriedades viscoelásticas que contribuem para a lubrificação e melhoria da função articular<sup>72</sup>. Apresenta uma taxa elevada de sucesso para reduzir a claudicação e a efusão sinovial em animais com OA<sup>73</sup> – ação SMOAD. Embora o seu mecanismo de ação não seja conhecido, sabe-se que a viscosidade do gel é semelhante ao do fluido sinovial em condições normais, e como não é degradado pelas MPs, torna-se útil para restaurar a viscosidade em articulações afetadas com OA a longo prazo. Além disso, acredita-se que possa beneficiar a cicatrização da cartilagem – ação DMOAD<sup>74</sup>. De acordo com uma investigação de Tnibar et al. (2015) para avaliar a eficácia do gel de poliacrilamida durante dois anos em animais com OA, os efeitos foram evidentes no primeiro mês após a injeção IA e mantiveram-se durante dois anos e sem efeitos adversos, o que preconiza o seu longo tempo de ação, eficácia e segurança da sua utilização<sup>72,73</sup>.

### 2.5.11 Terapias biológicas

O uso de terapias biológicas tem vindo a aumentar substancialmente dadas as suas propriedades anti-inflamatórias e regenerativas e, ainda, por serem uma fonte de fatores de crescimento, essenciais para a regulação de diversas funções orgânicas. São uma alternativa benéfica quando comparadas às terapias convencionais com corticosteroides, sendo úteis no controlo da OA em pacientes com distúrbios metabólicos e em casos não responsivos a tratamentos prévios<sup>15</sup>. A sua ação baseia-se essencialmente na modulação da resposta de mediadores inflamatórios que desencadeiam a doença articular degenerativa, sendo as MPs e a IL-1 os principais alvos terapêuticos<sup>57</sup>.

#### 2.5.11.1 Células estaminais mesenquimais (MSCs)

Definidas como células progenitoras com capacidade de se replicar e diferenciar em diferentes tipos de células, inclusive em condrócitos, são uma potencial estratégia para a regeneração de CA lesionadas<sup>5,75</sup>. São várias as fontes de MSCs para a sua administração IA nomeadamente: medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, sangue periférico, membrana e líquido sinoviais<sup>75</sup>. Estas possuem efeitos imunogénicos modeladores e anti-inflamatórios<sup>5</sup> que, de acordo com a bibliografia, permitiram a melhoria do ambiente articular inclusive da cartilagem, e o retorno ao nível de trabalho anterior<sup>75</sup>. No entanto, a melhor abordagem terapêutica ainda permanece bastante controversa no que diz respeito à origem celular de MSCs mais adequada, à dose, ao esquema de tratamento, ao uso de fontes autólogas ou alogénicas, entre outros fatores<sup>75</sup>.

#### 2.5.11.2 Terapia genética

Comparativamente aos tratamentos convencionais com fármacos com tempos de vida relativamente curtos, a terapia genética constitui uma excelente opção, já que uma única injeção IA resulta na produção de proteínas específicas por períodos longos de tempo. Em particular a terapia genética aplicada à OA, é usada para efeitos condroprotetores, sendo o gene que codifica o recetor antagonista da IL-1 (IL-1Ra), o mais usado. A técnica consiste, primeiramente, na isolamento e manipulação do gene, seguidas da sua transferência para o núcleo dos sinoviócitos de articulações afetadas (transdução) por intermédio de um vetor (adenovírus). A administração IA resulta na produção dose-dependente e prolongada no tempo de proteínas – IL-1Ra – no líquido

sinovial<sup>76</sup>. De acordo com os modelos experimentais<sup>77,78</sup>, a transferência genética resultou na redução dose-dependente da expressão das MPs, da erosão da CA, das alterações histológicas e da incidência de osteófitos, bem como na redução do grau de dor e de claudicação clínicas – ação DMSOAD e SMOAD<sup>57</sup>. Devido às limitações da terapia genética relativas à necessidade de vetores mais efetivos, métodos alternativos para o uso do IL-1Ra têm sido cada vez mais estudados<sup>57</sup>.

#### 2.5.11.3 Soro autólogo condicionado (ACS ou IRAP)

O uso de ACS para tratamento de OA tem aumentado significativamente nos últimos anos, sobretudo em cavalos de desporto<sup>15</sup>. O ACS também conhecido por IRAP é um produto sanguíneo processado com uma elevada concentração da proteína anti-inflamatória denominada por IRAP – proteína antagonista do recetor da interleucina 1. Esta proteína é produzida endogenamente por células do sistema imunitário, principalmente pelos monócitos e age como antagonista competitivo da IL-1<sup>79</sup>. Atualmente sabe-se que os leucócitos podem ser estimulados *ex vivo* para produzir IRAP e assim constituir o soro concentrado. Contudo, os kits comerciais disponíveis: IRAP I (Orthokine®) e IRAP II (Arthrex®) permitem uma concentração superior de IRAP, mas também de IL-10 e de outros fatores de crescimento como o IGF-1 e o TGF- $\beta$ <sup>5</sup>.

O processo consiste primeiramente na colheita de sangue periférico do cavalo com uma seringa especializada que contém esferas embebidas em sulfato de crómio, seguida de incubação durante 24 horas e posterior centrifugação<sup>57</sup>. Embora existam vários planos terapêuticos, o ACS é administrado por via exclusivamente IA a cada sete a dez dias dividido entre três a cinco tratamentos, com volume variável consoante o tamanho da articulação. Recomenda-se o seu uso em articulações afetadas com sinovite, capsulite e OA<sup>79</sup>. Segundo o estudo *in vivo*<sup>80</sup>, o ACS demonstrou ter propriedades DMOAD e SMOAD na medida em que, nos cavalos tratados, houve uma redução do grau de claudicação e da hiperplasia da membrana sinovial avaliada histologicamente. Além disso, não foram registados efeitos secundários adversos e os níveis de IRAP mantiveram-se elevados durante o período de tratamento. O ACS apesar de ser logisticamente mais exigente, tem-se demonstrado bastante benéfico comparativamente aos corticosteroides, para o tratamento de doenças articulares com e sem lesões concomitantes dos tecidos moles<sup>15</sup>.

#### 2.5.11.4 Plasma rico em plaquetas (PRP)

O PRP, em sentido restrito, é um produto biológico definido como um volume de plasma com uma concentração de plaquetas superior ao do sangue total. A sua preparação implica a colheita de sangue autólogo seguida de centrifugação ou filtração, pois as plaquetas são as células do plasma sanguíneo com densidade e dimensões menores. O efeito terapêutico do PRP implica a ativação e posterior desgranulação das plaquetas (Figura 20<sup>81</sup>) - grânulos- $\alpha$  - da qual resulta a libertação de uma série de proteínas, nomeadamente citoquinas, moléculas bioativas e fatores de crescimento, que modulam a resposta inflamatória e imunitária e favorecem a cicatrização, ao estimularem a migração, proliferação e diferenciação celulares, a síntese da MEC (colagénio e GAG) e a angiogénese<sup>81,82</sup>.

Embora o PRP seja usado maioritariamente no tratamento de ligamentos e tendões<sup>15</sup>, estudos têm demonstrado a sua segurança e eficácia no tratamento de OA em vários modelos animais, com resultados promissores relacionados com efeitos SMOAD e DMOAD<sup>82</sup>. A sua aplicação em cavalos com OA tem sido igualmente demonstrada pelas melhorias dos sinais clínicos relacionados com a dor e claudicação e pelo retorno ao nível de performance anterior<sup>83</sup>. Os efeitos positivos do PRP têm contribuído para o interesse crescente do seu uso na medicina desportiva. Contudo, esforços devem ser realizados para obter informação mais clarificada relativamente ao modo de preparação e aplicação consoante o tipo de tecido, à dose e frequência da sua utilização e desta forma, otimizar o seu uso em equinos<sup>83</sup>.

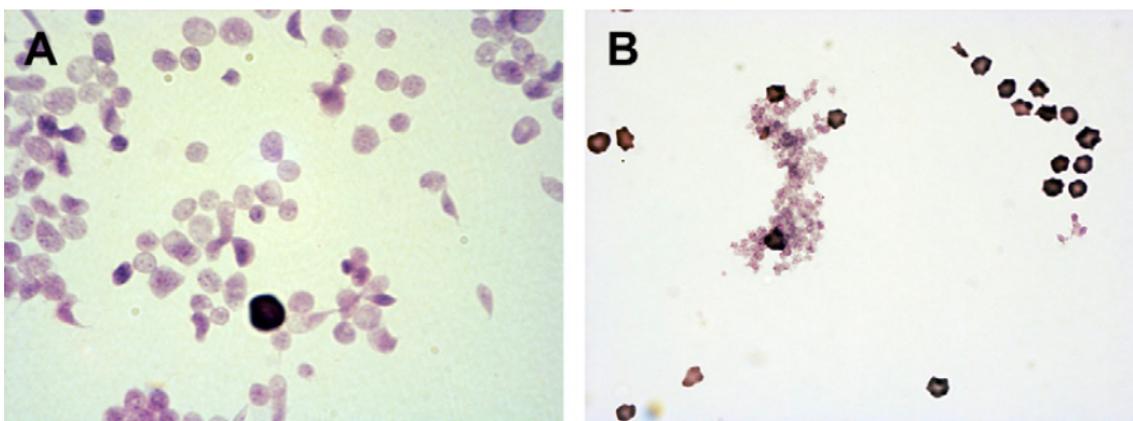


Figura 20 - Aparência histológica do PRP (A) - Plaquetas inativadas ovoides e com grânulos no seu interior (B) - Plaquetas ativadas, em agregados e com forma alterada após desgranulação. (Adaptada de <sup>81</sup>)

### 2.5.12 Reabilitação física

São várias as técnicas de reabilitação atualmente disponíveis para o tratamento da doença articular degenerativa, contudo, nenhuma técnica isolada é eficazmente superior relativamente a outra (Tabela 3). A crioterapia, a terapia por calor, ultrassons pulsados de baixa intensidade, ondas de choque extracorporais, laser de baixa intensidade, neuroestimulação elétrica transcutânea (TENS), estimulação neuromuscular (EMS), terapia através de campo magnético pulsado, terapias aquáticas (exemplo: passeadeira aquática) são alguns exemplos aplicados no controlo da dor e inflamação. Além disto, a propriocepção e a estabilidade articular são condicionantes da OA que devem ser controladas, por exemplo, através da aplicação de bandas neuromusculares, tapes (exemplo: Kinesio®), pesos nos membros, varas e/ou cavaletes. A rigidez articular, em consequência da dor e mobilidade reduzida, pode ser atenuada através de terapias por calor, alongamentos e de mobilizações manuais do sistema músculo-esquelético. Por último, o controlo neuromuscular reduzido pode ser estimulado através de programas de exercício controlado – passadeiras, passadeiras aquáticas, guias mecânicas, bandas elásticas, com ou sem arreios – em superfícies apropriadas à condição do animal<sup>84</sup>.

Tabela 3 - Maneio da OA aplicado aos objetivos da reabilitação física. (Adaptado de <sup>84</sup>)

Objetivos da reabilitação para a OA	Coadjuvantes a aplicar pelos proprietários
MANEIO DA DOR	Crioterapia; duches de água quente ou fria; AINEs.
PROPRIOCEPÇÃO E ESTABILIDADE ARTICULAR	Trabalho com pesos, varas, cavaletes; adequar as superfícies de trabalho; ferração ortopédica.
FLEXIBILIDADE	Alongamentos diários; exercícios de mobilização articular; períodos contínuos em pastagens; <u>evitar</u> o confinamento em boxe.
FORÇA E RESISTÊNCIA	Treinos controlados e adaptados à condição do animal – com cavaleiro, em guias mecânicas, passadeiras, com arreios, entre outros.
AQUECIMENTO, REPOUSO E RECUPERAÇÃO	Períodos de repouso após exercícios intensos; monitorizar a atitude e performance do cavalo.
MODIFICAÇÕES AMBIENTAIS	Providenciar abrigos quentes e secos; boxes e camas com dimensões adequadas; superfícies suaves e consistentes para prevenir lesões ou sobrecargas articulares; remover obstáculos; usar redes de feno e fontes de água elevadas são

benéficas para OA das cervicais; fornecer ração em superfícies elevadas e pastagens contribuem para a flexibilidade do pescoço e desenvolvimento muscular; perda de peso pode estar indicada em pacientes obesos.

### 2.5.13 Ferração ortopédica

Considerando a ligação íntima entre a silhueta externa e a função interna do casco, a correção da forma e o corte do casco permitem maximizar a função do casco e reduzir o stress que é dissipado pelo sistema músculo-esquelético, essenciais quer para a prevenção de lesões, quer para o tratamento de doenças já estabelecidas<sup>85</sup>. Os objetivos da ferração ortopédica são: atenuar a concussão das estruturas com palmilhas ou ferraduras de alumínio; mover o centro de pressão do casco consoante a área do casco que se pretende reduzir o stress; otimizar a distribuição das forças aplicadas no casco para corrigir desequilíbrios médio-laterais; otimizar a biomecânica ao reduzir o stress da articulação IFD imediatamente antes da fase *breakover* do movimento (quando os talões se destacam da superfície), quer pela elevação dos talões, quer pela mudança do ponto de *breakover* em sentido caudal através do *rolling* de pinças; ajustar a deslizamento entre o casco e a ferradura (tração); e por último, melhorar a fase de suspensão do movimento<sup>86</sup>.

Em particular, a doença articular é caracterizada pela diminuição da integridade da superfície articular da CA e redução da amplitude de movimento, com um grau de dor associado ao impacto, flexão e/ou extensão excessivas. A ferração ortopédica, neste caso, pretende facilitar o movimento e limitar a concussão das estruturas associadas ao impacto. Para isso, o efeito da alavanca deve ser reduzido recuando ligeiramente a ferradura para facilitar a saída do casco do chão, e em casos de OA das articulações inter-falângicas, deve ser feito um *full rolling* em todo o perímetro da ferradura<sup>86</sup>.

## 3. Solução de proteína autóloga (APS): opção promissora para o tratamento de osteoartrite?

Os conceitos emergentes relativos à progressão da OA permitiram o desenvolvimento de novos tratamentos mais específicos<sup>87</sup>. Embora, hoje em dia, hajam inúmeras opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da OA, as terapias biológicas regenerativas são uma opção de interesse crescente, nas quais se inclui a solução de proteína autóloga (APS) pois, têm colmatado as limitações dos tratamentos convencionais

existentes. Apesar da evidência científica ser ainda limitada, as soluções autólogas derivadas do sangue tais como a APS e o ACS, têm demonstrado ser seguras e bem toleradas, com efeitos positivos no controlo da dor e na funcionalidade dos membros, em casos de OA ligeira a moderada<sup>88</sup>. São uma opção viável em pacientes não responsivos a tratamentos conservativos ou em pacientes com OA severa antes de se recorrer à cirurgia<sup>88,89,90,91</sup>. Todavia, caso os sinais clínicos persistam após o uso prudente de tratamentos não invasivos, a cirurgia deve então, ser considerada. Por esta razão, devem “idealmente” ser aplicados em fases precoces da doença, de maneira a limitar ou prevenir a sua progressão<sup>92</sup>.

### **3.1 Solução de proteína autóloga**

A APS é uma terapia regenerativa relativamente recente e que foi desenvolvida com o intuito de combinar os benefícios de outros dois produtos derivados de sangue autólogo: ACS e PRP<sup>93</sup>. Ou seja, para criar um produto rico em fatores bioativos, é inicialmente obtido um PRP que é submetido, de seguida, a um processo que envolve esferas de poliacrilamida e que garante a produção e concentração das proteínas pretendidas (semelhante ao ACS)<sup>94,95</sup>. Este é um produto derivado do plasma, altamente concentrado em plaquetas, fatores de crescimento anabólicos e citoquinas anti-inflamatórias (derivadas dos leucócitos), por intermédio de um processo de dupla-centrifugação. Ao contrário do ACS, para a sua obtenção, não é necessário um período de incubação de 24 horas, tornando a APS um produto mais apelativo e conveniente para a prática clínica<sup>93</sup>. O kit Pro-Stride® é a formulação comercial existente<sup>96</sup>. De acordo com inquéritos realizados aos proprietários num estudo realizado por Velloso et al. (2020), os resultados têm sido promissores com efeitos superiores a um ano, sendo que mais de 95% dos participantes observaram melhorias superiores a 50% nos cavalos que foram tratados com APS<sup>95</sup>.

### 3.2 Preparação da APS – Kit Pro-Stride®

#### 3.2.1 Material:

Para a preparação de uma infiltração de APS (Pro-Stride®) é necessário o seguinte material: Kit de solução de proteína autóloga (Pro-Stride®) com duas câmaras estéreis (Figura 21); um cateter borboleta de aférese; um anticoagulante ACD-A (citrato de dextrose); uma seringa Omnifix 60ml; uma seringa Luer Lock 30ml; uma seringa Luer Lock 10ml; uma seringa Luer Lock 5ml (Figura 21); duas câmaras (contrapesos azul e verde); e uma centrifugadora (Figura 22)<sup>97</sup>.



Figura 21 - Kit de solução de proteína autóloga (APS) à esquerda; seringas Omnifix no centro e Luer Lock à direita. (Fotografia de autoria própria)



Figura 22 - Centrifugadora usada para a preparação da solução de proteína autóloga. (Fotografia cedida por colega Ana Tareco)

### 3.2.2 Preparação (passo a passo):

- 1- Preparar assepticamente a região para colheita de sangue periférico autólogo da veia jugular<sup>97</sup> (Figura 23);
- 2- Colher entre 52-55ml de sangue venoso, de forma lenta (aproximadamente 1ml/segundo), diretamente para uma seringa Omnifix de 60ml acoplada a um cateter borboleta específico de aférese (Figura 23), onde foi previamente adicionado entre cinco a oito mililitros de anticoagulante ACD-A (citrato de dextrose), até perfazer o volume de 60ml. Misturar lentamente o anticoagulante com o sangue na seringa enquanto se aspira<sup>97</sup> (Figura 24);



Figura 23 - Colheita de sangue venoso com seringa Omnifix de 60ml acoplada a cateter borboleta. Notar assepsia da região. (Fotografia cedida por colega Ana Tareco)

- 3- Transferir lentamente (aproximadamente a 1ml/segundo) a amostra de sangue venoso para o dispositivo separador APS (*APS separator*)<sup>97</sup> (Figura 24);
- 4- Colocar o separador APS e um contrapeso ajustável de 60 ml de água (câmara azul) e de seguida, centrifugar durante 15 minutos a 3200rpm<sup>97</sup>(Figura 24);
- 5- Após a centrifugação, obtêm-se três frações distintas no separador APS enumeradas, em seguida, pela ordem em que surgem desde a zona superior até à zona inferior do dispositivo: **a)** plasma pobre em plaquetas (PPP); **b)** concentrado de leucócitos, plaquetas, fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias num reduzido volume de plasma (PRP); **c)** glóbulos vermelhos. Em primeiro lugar, remover o PPP com o auxílio de uma seringa Luer Lock de 30ml e descartar; de seguida, recolher o PRP filtrado com uma seringa Luer Lock de 10ml e transferi-la para o segundo dispositivo concentrador APS (*APS concentrator*)<sup>97</sup> (Figura 24);
- 6- Colocar o concentrador APS e um contrapeso ajustável (câmara verde) e de seguida, centrifugar durante dois minutos a 2000rpm<sup>97</sup>. É nesta fase que o PRP entra em contacto com as esferas de poliacrilamida (agente desidratante), permitindo obter uma solução APS concentrada cerca de duas a três vezes superior

em células e proteínas - fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias – comparativamente ao sangue total<sup>95,96</sup> (Figura 24);

7- Com a região da respectiva articulação preparada assepticamente, transferir a solução APS para uma seringa Luer Lock de 5ml e administrá-la por via IA<sup>97</sup> (Figura 24).

<p><b>1</b></p>  <p><b>COLHER SANGUE PERIFÉRICO PARA SERINGA COM ACD-A (52-55ML)</b></p>	<p><b>2</b></p>  <p><b>TRANSFERIR SANGUE PARA DISPOSITIVO SEPARADOR APS</b></p>	<p><b>3</b></p>  <p><b>COLOCAR NA CENTRIFUGADOR A DISPOSITIVO SEPARADOR APS E CONTRAPESO</b></p>	<p><b>4</b></p>  <p><b>1ª CENTRIFUGAÇÃO:</b> 3200rpm 15 minutos</p>
<p><b>5</b></p>  <p><b>RETIRAR PPP (e descartar)</b></p>	<p><b>6</b></p>  <p><b>TRANSFERIR SUSPENSÃO CELULAR (PRP) PARA UMA SERINGA DE 10mL</b></p>		
<p><b>7</b></p>  <p><b>TRANSFERIR SUSPENSÃO CELULAR (PRP) PARA DISPOSITIVO CONCENTRADOR APS</b></p>		<p><b>8</b></p>  <p><b>2ª CENTRIFUGAÇÃO:</b> 2000rpm 2 minutos</p>	<p><b>9</b></p>  <p><b>TRANSFERIR A APS (2-3ml) PARA SERINGA 5ml</b> <u>Produto pronto a administrar via IA</u></p>

This device is for veterinary use only. Use standard aseptic technique throughout device processing instructions. All trademarks are the property of Zoetis Services LLC or a related company or a licensor unless otherwise noted. © 2021 Zoetis Services LLC. All rights reserved. PRS-00001

**zoetis**

Figura 24 – Método de preparação da APS – kit Pro-Stride® (passo a passo). (Adaptado de <sup>97</sup>)

### 3.3 Protocolo terapêutico e requisitos

Primeiramente, é importante avaliar a necessidade deste tipo de terapia através de um exame locomotor exaustivo do candidato, que deve incluir anamnese, exame estático e dinâmico e radiografias. Isto irá fornecer um prognóstico útil e fiável para o rastreio de casos que possam beneficiar de uma infiltração com APS<sup>98</sup>, já que se trata de um tratamento de custo elevado<sup>99</sup>. O tratamento consiste numa administração singular de APS previamente obtida a partir de kits comerciais (Pro-Stride®) por via IA, seguidas de um período de repouso e depois de um regresso gradual ao trabalho normal<sup>97,100</sup>.

A infiltração com APS está preconizada para casos ligeiros a moderados de OA, isto é, em casos em que o grau de claudicação segundo a escala da AAEP seja idealmente inferior a 4 e cujas radiografias não apresentem lesões severas como osteófitos marginais significativos, esclerose subcondral ou perda de espaço articular<sup>98</sup>. A literatura mais recente confirmou que a resposta clínica à APS dos pacientes com OA grave no joelho foi inferior à dos pacientes com graus mais ligeiros da doença<sup>101</sup>. Embora pouco descrito em equinos, está também indicada para o tratamento de lesões em ligamentos e tendões<sup>102</sup>.

Em termos práticos pode ser aplicada em cavalos jovens de alta performance que apresentem sinais clínicos articulares de maneira a minimizar o uso de corticosteroides; em cavalos mais velhos com doenças metabólicas (exemplo: síndrome de Cushing); e em cavalos em períodos de competição ativa, pois a APS não é detetada nos testes de *doping*<sup>103,104</sup>.

### 3.4 Composição da APS

A APS é composta por três constituintes principais: leucócitos que são a fonte primária de citocinas anti-inflamatórias (antagonistas da IL-1: IL-1Ra e sIL-1RII; antagonistas do TNF- $\alpha$ : sTNF-RI e sTNF-RII; IL-6 e IL-10<sup>93,105,106</sup>), plaquetas que fornecem fatores de crescimento anabólicos (derivados de plaquetas: PDGF-AB, PDGF-BB; TGF- $\beta$ ; fator de crescimento epidérmico (EGF); IGF-1<sup>96,105</sup>) e por último, um reduzido volume de plasma concentrado quer em proteínas anti-inflamatórias, quer em fatores de crescimento anabólicos<sup>98</sup>. Sendo um produto derivado do sangue que visa concentrar os seus constituintes anti-inflamatórios, concentra de igual modo as citocinas inflamatórias – IL-1, TNF- $\alpha$ , MMP-3 – naturalmente presentes<sup>107</sup>, embora o seu aumento seja, em proporção, inferior ao aumento das citocinas anti-inflamatórias<sup>105,108</sup>. Devido à

sua constituição combinada e superior relativamente ao sangue total, de células e moléculas que intervêm em múltiplas vias da inflamação, a terapia com APS tem-se demonstrado potencialmente efetiva no tratamento da OA pelos seus efeitos condroprotetores e anti-inflamatórios promissores<sup>98,105</sup>.

O quadro clínico dos pacientes não parece influenciar significativamente a composição em citocinas da APS, na medida em que foram observadas concentrações sinoviais semelhantes de citocinas anti-inflamatórias e de fatores de crescimento anabólicos entre pacientes com OA e pacientes “saudáveis” pertencentes ao grupo controlo<sup>105</sup>.

### 3.5 Mecanismo de ação da APS

O tratamento com APS foi desenvolvido com o propósito de atenuar a cascata inflamatória de articulações afetadas, mediada pelas principais citocinas envolvidas na sua patogénese – IL-1 e TNF $\alpha$ <sup>87,92</sup>. Contudo, os mecanismos pelos quais isto acontece não são ainda totalmente conhecidos<sup>93</sup>.

Os kits de APS providenciam um forte *output* anti-inflamatório, pois possuem na sua constituição as citocinas anti-inflamatórias: IL-1Ra (ou IRAP), sIL-1RII – recetores antagonistas da IL-1 – e sTNF-RI, sTNF-RII – recetores antagonistas do TNF- $\alpha$ <sup>105,109</sup> (Figura 25<sup>92</sup>). Estas são proteínas que se ligam competitivamente aos recetores das citocinas pro-inflamatórias, inativando a sua atividade responsável por iniciar a cascata inflamatória dos condrócitos osteoartríticos através da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB)<sup>93,110</sup>. De acordo com o estudo de Linardi et al. (2019), comparativamente ao soro, a APS apresentou um aumento significativo de IL-1Ra e do rácio IL-1Ra:IL-1 (1500:1)<sup>93</sup>. Este rácio foi correlacionado com a melhoria do nível de dor após a administração de APS em humanos com OA nos joelhos<sup>111</sup>. Graças à presença celular de leucócitos nesta solução, há uma produção elevada e continuada destas moléculas anti-inflamatórias<sup>105,111</sup>. Além destas, a IL-10 e a IL-6 também se encontram em concentrações superiores na APS, ambas com efeitos condroprotetores<sup>93</sup>. Apesar de a IL-6 ser anteriormente considerada uma citocina catabólica<sup>112</sup>, a literatura mais recente sugere o seu papel modulatório sobre a homeostase dos condrócitos que constituem a cartilagem dos equinos<sup>113,114</sup>. Em adição, os fatores de crescimento derivados das plaquetas contribuem para a ação anti-inflamatória e regenerativa das lesões provocadas pela OA<sup>105</sup>.

Em pormenor, o IGF-1 estimula a diferenciação das células estaminais da linha condrogénica e a deposição de MEC<sup>115</sup>, enquanto que o PDGF promove a produção de colagénio pelos condrócitos<sup>116</sup>, e em conjunto reduzem a atividade da IL-1 e logo, a degradação da CA<sup>117</sup>. Por último, o EGF tem demonstrado um papel positivo sobre a proliferação dos condrócitos<sup>118</sup>, e o TGF- $\beta$  reduz a inflamação ao exercer efeitos imunossupressores sobre os linfócitos e por outro lado, estimula também a condrogénese<sup>119</sup>.

Segundo um modelo *in vitro* realizado em condrócitos humanos, a APS inibiu a produção de MMP-13 estimuladas pela IL-1 e pelo TNF- $\alpha$ <sup>98,120</sup>. Apesar do efeito sinérgico entre as duas citocinas catabólicas que estimulam a libertação de MMP-13, a sua produção é na mesma inibida pelos condrócitos, o que pode ser justificado pela combinação múltipla de citocinas anabólicas e anti-inflamatórias<sup>92,120</sup>. Estes resultados sugerem que a conjugação de diferentes fatores na composição da APS é mais efetiva que uma concentração elevada de um único tipo de proteína<sup>120</sup>. Em adição, o modelo *in vitro* em equinos demonstrou uma tendência desta solução não só para reduzir a atividade de enzimas catabólicas da matriz - MMP-1, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 -, mas também para reduzir a PGE<sub>2</sub><sup>99</sup>, o que é essencial para a impedir a progressão da doença articular degenerativa. Por outro lado, a APS aumentou a expressão de genes codificantes da IL-10, bem como do colagénio tipo II e do *agrecan*<sup>99</sup>.

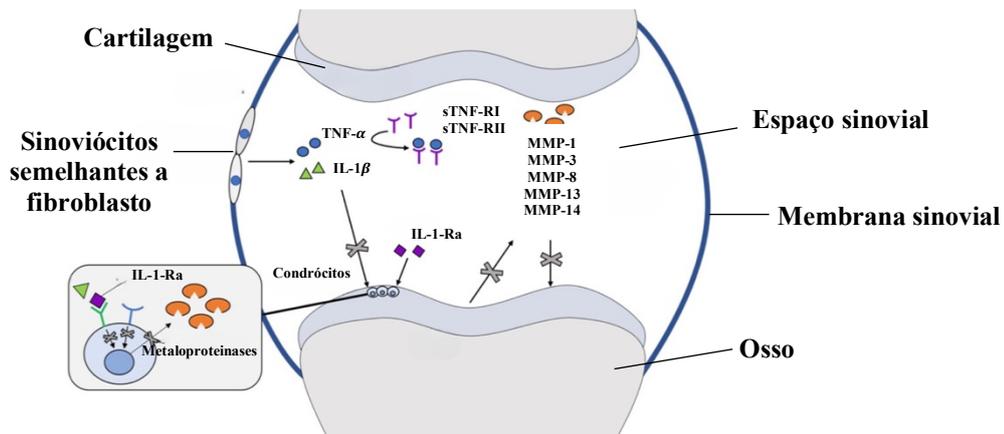


Figura 25 - Composição e mecanismo de ação da APS (Adaptada de <sup>92</sup>)

### 3.6 Comparação entre APS e ACS

De acordo com um estudo recente aplicado a um modelo de OA *in vitro*, o ACS e a APS possuem uma eficácia condroprotetora e anti-inflamatória superior e dose-dependente, quando comparadas com as terapias convencionais com triancinolona<sup>99</sup>.

Sendo os métodos de preparação de ACS e APS distintos, o perfil de citocinas é igualmente distinto<sup>108</sup>. Estas novas terapias intra-articulares devem ser desenvolvidas de modo a garantir a presença prolongada de citocinas no espaço articular. Na preparação do ACS, a maioria das citocinas são libertadas durante as primeiras seis horas de incubação (períodos superiores a 24 horas de incubação reduzem a sua bioatividade<sup>107</sup>) e embora a administração IA de ACS origine uma redução acentuada da IL-1 e um aumento do IL-1Ra no líquido sinovial durante as primeiras quatro horas após injeção, os seus efeitos não são superiores a 48 horas<sup>121</sup>. Segundo Lasarzik et al. (2018), os tratamentos com ACS aplicados em intervalos de dois dias e repetidos três a quatro vezes são mais eficazes que os tratamentos preconizados com injeções semanais de soro condicionado<sup>121</sup>. Em oposição, uma administração única de APS produz uma concentração terapêutica de citocinas prolongada no tempo com potenciais efeitos DMOAD e SMOAD que podem ser superiores a um ano<sup>94,98,108</sup>.

Embora o princípio-base para a obtenção dos hemoderivados, quer da ACS, quer da APS seja conhecido, existem algumas limitações para a sua utilização, nomeadamente: variabilidade biológica individual dos pacientes e padronização insuficiente dos protocolos referentes à sua preparação e aplicação, e que das quais resultam concentrações inconsistentes dos fatores bioativos e logo, respostas modulatórias e clínicas heterogêneas<sup>108</sup>.

Os resultados promissores da APS e as vantagens do seu ponto de vista prático, podem levar os médicos veterinários a preferir o seu uso<sup>94</sup>, no entanto, não existe suporte científico suficiente que comprove a superioridade da APS relativamente à ACS<sup>93,108</sup>. Ambas as terapias podem beneficiar de investigações adicionais e do refinamento dos seus métodos de preparação (exemplo: produto alogénico) e da aplicação clínica dos seus produtos<sup>108</sup>.

### **3.7 Vantagens da APS**

A APS permite uma abordagem prática e facilitada uma vez que requer um período de preparação curto e tecnicamente pouco exigente (inferior a 20 minutos) e com o auxílio de uma centrifugadora portátil, permite a obtenção do produto final pronto a administrar em regime de ambulatório, de forma segura e efetiva<sup>98,108</sup>. De acordo com o estudo clínico *in vivo* realizado em 40 cavalos com OA previamente diagnosticada, a APS demonstrou: eficácia na melhoria dos sinais clínicos, nomeadamente do grau de claudicação, da simetria dos apoios e do grau de amplitude articular sem dor associada; análises normais de líquidos sinoviais de articulações com OA em exercício; e, por último, uma avaliação geral positiva dos proprietários durante o período de um ano após o tratamento<sup>98</sup>.

Em termos comparativos com o ACS, a solução de proteína autóloga possui concentrações superiores de citocinas anti-inflamatórias e de fatores de crescimento anabólicos<sup>106</sup>. Isto porque a presença de células – leucócitos - na APS permite a produção continuada de citocinas anti-inflamatórias após a injeção e, ainda porque a APS não é submetida a processos de incubação seguidos de congelação, o que contribui para a degradação das citocinas e para o comprometimento da viabilidade dos leucócitos<sup>105,122</sup>. Dada a facilidade da sua preparação, os médicos veterinários recorrem mais frequentemente à APS para o tratamento da doença articular degenerativa em equinos<sup>98</sup>. Além disto, por ser considerada uma terapia biológica, proporciona um meio mais próximo do “natural”, o que pode torná-la preferível em relação às terapias anti-inflamatórias comuns, do mesmo modo que constitui uma alternativa aos fármacos proibidos nas competições equestres<sup>108</sup>.

Em suma, a APS ao conjugar os benefícios do PRP e do ACS segundo o seu modo de preparação específico<sup>93,97</sup>, possui efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, condroprotetores e regenerativos sobre as articulações afetadas que se podem traduzir por efeitos SMOAD e DMOAD<sup>93,98</sup>.

### **3.8 Desvantagens da APS**

Apesar dos benefícios descritos, existem algumas limitações inerentes a este tratamento. Entre elas, destacam-se os custos elevados associados, superiores às terapias convencionais<sup>99</sup>. Além disso, outras condicionantes da sua aplicação prática surgem

devido à variabilidade biológica individual dos pacientes (produto de origem autóloga) que origina produtos com diferentes propriedades clínicas e à padronização insuficiente dos protocolos, contribuindo ambos para resultados dúbios e variados<sup>80,108</sup>. De igual modo, a APS apresenta padrões de resposta e níveis de eficácia variáveis dependendo da fase mais ou menos avançada de OA no momento da sua administração, sendo que o seu efeito terapêutico em pacientes com OA crónica e severa é limitado e insuficiente para provocar melhorias dos seus quadros clínicos<sup>94,108</sup>.

Secundariamente à sua administração em pacientes com OA, embora pouco frequentes, estão descritos alguns efeitos adversos em humanos tais como: artralgia, efusão e rigidez articulares, dor e desconforto no local e náuseas associadas, que se resolveram rapidamente<sup>87,92,109</sup>.

### **3.9 Outras espécies-alvo do tratamento**

A APS também é aplicada na prática clínica de outras espécies, tais como em cães e seres humanos<sup>94,102,123</sup>.

O estudo clínico *in vivo* realizado em cães demonstrou efeitos clínicos positivos para o tratamento da OA ligeira a moderada, bem como para o tratamento de lesões de tecidos moles e para a sua aplicação em pós-cirurgia, com efeitos analgésicos e mínimas reações adversas secundárias<sup>102</sup>. Em particular, a aplicação mais frequente dos kits APS em tecidos moles foi após a cirurgia de ligamentos cruzados anteriores do joelho e as articulações mais frequentemente infiltradas foram a coxofemoral e a femoro-tibio-patelar. O alívio da dor manteve-se por um período igual ou superior a um ano, sendo que alguns animais repetiram o tratamento anualmente consoante a necessidade. Embora a maioria dos casos tenham sido bem sucedidos, um reduzido número não respondeu eficazmente a esta terapia, o que pode ser justificado pela severidade da doença articular dos pacientes<sup>102</sup>.

Tal como nos equinos, também a OA em medicina humana é considerada uma doença global e emergente, sendo uma das causas mais comuns para a incapacidade crónica motora em adultos devido à dor e perda de função resultantes<sup>124,125</sup>. De acordo com os dados mais recentes do estudo do *Global Burden of Disease (2022)*, os casos prevalentes de OA aumentaram 113,25%, de 247,51 milhões em 1990 para 527,81 milhões em 2019<sup>125</sup>. De acordo com o parâmetro “anos vividos com incapacidade” (YLD

– *years of healthy life lost due to disability*) associada à OA, o seu valor continua a aumentar, atingindo 18,9 milhões das YLD globais<sup>126</sup>. O estudo realizado em pacientes com OA no joelho comprovou o efeito a longo prazo de uma única administração de APS com segurança e melhorias sintomáticas significativas<sup>87</sup>. Aos 12 meses após a injeção, a melhoria dos níveis de dor no grupo APS foi de 65%, enquanto que no grupo de controlo foi de 41%. A análise imagiológica de ressonâncias magnéticas feitas antes e 12 meses após o tratamento revelaram diferenças significativas entre os dois grupos, sendo que no grupo de controlo houve aumento das lesões, contrariamente ao grupo APS cujas lesões se mantiveram inalteradas<sup>87</sup>. No seguimento do estudo, o efeito analgésico manteve-se por um período de até três anos em pacientes infiltrados com APS, confirmando a segurança e eficácia desta terapia em casos de OA ligeira a moderada<sup>94</sup>.

## **II – Estudo**

### **4. Avaliação do Tratamento Intra-articular com Solução de Proteína Autóloga em Equinos: Estudo retrospectivo**

#### **4.1 Introdução**

As articulações são estruturas altamente diferenciadas compostas por variados tecidos conjuntivos, que em conjunto constituem um elemento pivô do sistema músculo-esquelético do cavalo<sup>1,2</sup>. Atualmente sabe-se que a doença músculo-esquelética constitui um ponto crítico na saúde, bem-estar e performance desportiva dos cavalos, sendo um dos motivos mais frequentes de consulta veterinária e a principal causa responsável pelos prejuízos na indústria equina<sup>11</sup>. A OA ou doença articular degenerativa representa a afeção músculo-esquelética crónica mais importante no cavalo sendo responsável por aproximadamente 60% das claudicações diagnosticadas<sup>1,26</sup>. Define-se como uma doença degenerativa da cartilagem articular associada a alterações ósseas e/ou nos tecidos moles. Em última instância, a degradação da cartilagem é um ponto crítico e irreversível da doença<sup>5</sup> manifestado através de inflamação, efusão, dor intensa, redução da amplitude dos movimentos articulares e redução da função do membro<sup>1</sup>. A sua relevância clínica é equiparável ao homem devido ao forte impacto na qualidade de vida das populações a nível mundial – dor, incapacidade motora e perdas económicas<sup>25,26</sup>.

O tratamento implica um diagnóstico definitivo correto, uma avaliação completa do paciente, uma ponderação dos objetivos do tratamento e por último e não menos importante, a consideração das expectativas e do poder económico dos proprietários. Assim, defende-se que a abordagem multimodal através de terapias tradicionais ou biológicas intra-articulares, medicação sistémica de suporte e/ou suplementação, reabilitação física e do maneio (alimentação, exercício e ferração), é essencial para controlar os sinais clínicos e minimizar as consequências desta doença<sup>47,86</sup>. A escolha do tratamento adequado a cada caso é influenciada por fatores económicos e relacionados com a condição clínica do animal e com as regras das competições, pois há medicamentos não autorizados ou cujos tempos devem ser respeitados<sup>15</sup>. Apesar dos vários tratamentos tradicionais disponíveis práticos e mais baratos - AINE's, corticosteroides, AH, entre outros -, o tratamento da OA continua a ser um desafio<sup>98</sup>. Com o conhecimento crescente sobre a patogenia da OA e sobre o custo-benefício a longo prazo destas opções

convencionais, os investigadores têm-se focado no desenvolvimento de opções terapêuticas biológicas menos invasivas que atuem para além do nível sintomático<sup>92,99,102</sup>. Hoje sabe-se que existe um forte componente bioquímico no ciclo inflamatório da OA, pelo que um “meio” que contribua com fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias que permitam bloquear este ciclo e restabelecer a homeostasia articular com efeitos analgésicos a longo prazo, poderá ser uma solução promissora no futuro<sup>102,109</sup>. O tratamento com APS foi recentemente desenvolvido com o objetivo de produzir rapidamente um produto anti-inflamatório a partir de uma reduzida quantidade de sangue do próprio paciente. De acordo com ensaios clínicos anteriores, uma administração singular de APS tem demonstrado efeitos condroprotetores, anti-inflamatórios *in vitro* e *in vivo*, bem como efeitos analgésicos a longo prazo em equinos, cães e humanos<sup>87,98,102,127</sup>.

Em suma, não existem dados científicos suficientes que comprovem os benefícios da terapia com APS para que esta seja amplamente aceite como uma modalidade terapêutica da doença articular degenerativa, nem dados que demonstrem a sua superioridade relativamente a outras opções biológicas. Assim, o presente estudo propôs-se a realizar uma análise da resposta clínica à terapia intra-articular com APS em equinos, comparando o registo imagiológico e a apresentação clínica de cada indivíduo antes e depois do tratamento. Com este trabalho pretendeu-se avaliar a eficácia, segurança e prognóstico do seu uso, encorajando futuras investigações na área da ortopedia equina que permitam retirar conclusões sustentadas sobre a sua aplicabilidade prática na OA.

## **4.2 Objetivos**

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a eficácia e os fatores que possam influenciar a resposta clínica decorrente do tratamento intra-articular com solução de proteína autóloga em equinos e comparar com a escassa literatura científica existente<sup>98</sup>. Adicionalmente, pretendeu-se estudar se existe uma relação entre a apresentação clínica e radiológica; a relação entre cada uma destas e a relação com a resposta ao tratamento; avaliar a segurança do tratamento e ainda, investigar possíveis fatores que possam influenciar a necessidade de segunda administração de APS.

### 4.3 Material e métodos

O presente estudo foi realizado em análise retrospectiva a partir de dados recolhidos de casos clínicos de equinos diagnosticados com OA pelo Dr. Tomé Fino, na empresa Equimuralha, e que foram tratados com solução de proteína autóloga em regime de ambulatório entre janeiro de 2021 e março de 2023.

#### 4.3.1 Seleção da amostra e obtenção de dados

Foram incluídos no estudo, independentemente da idade, sexo, raça, disciplina e localização no território nacional, os equinos com os seguintes critérios: **a)** diagnóstico prévio de OA (bloqueio perineural ou intra-articular positivo) e/ou com registos imagiológicos; **b)** grau radiográfico até três inclusive (Tabela 4); **c)** resposta negativa a tratamentos anteriores (repouso, otimização da ferração, AINEs, corticosteroides) ou em seguimento pós-cirúrgico; **d)** sujeitos a tratamento IA com solução de proteína autóloga; **e)** último tratamento com APS no máximo há seis meses; **f)** margem financeira dos proprietários. Os equinos com lesões de grau radiográfico quatro, isto é, com alterações severas de OA, foram excluídos.

Os dados foram obtidos através da plataforma modular de gestão veterinária Pet Universal pertencente à empresa Equimuralha, em que foram retiradas informações relativas à identificação do animal (idade, sexo, raça, disciplina) e ao exame físico antes e depois do tratamento, sempre que disponíveis: articulação e respetivo(s) membro(s) afetado(s), grau de claudicação segundo a escala AAEP (0-5), presença de dor à flexão passiva (FP) e flexão ativa (FA), presença de efusão clínica e respetivo grau (ligeiro, moderado, severo). Além disso, foi recolhido o registo imagiológico por radiografia e atribuído um grau de acordo com a severidade das lesões (0-4)<sup>128</sup> (Tabela 4), o registo ecográfico quando presente, o registo de tratamentos que precederam a infiltração IA com APS, a resposta do indivíduo à terapia com APS avaliada através de consulta de reavaliação, a necessidade de reforço após o primeiro tratamento, quando necessário, a curto prazo (entre o primeiro e o sexto mês não inclusive) e a longo prazo (entre os seis meses e os 12 meses), presença de reações adversas e outros detalhes clínicos importantes para efeitos comparativos e conclusivos. A “resposta clínica” foi feita através dos dados referentes à avaliação do quadro clínico de cada indivíduo após o tratamento, classificando-se em: positiva (melhoria do grau de claudicação  $\geq 50\%$ , atribuindo-se (+));

parcialmente positiva (melhoria do grau de claudicação  $\leq 50\%$ , atribuindo-se (+/-)); negativa (grau de claudicação mantém-se igual ou agrava-se). Os dados foram registados e posteriormente convertidos para formato digital numa base de dados em Excel. O estudo foi planificado em função de cada articulação individualmente tratada. Para consultar os dados em detalhes, ver anexo 1, tabela 6.

### 4.3.2 Avaliação radiográfica

O diagnóstico de OA foi feito com base na avaliação radiográfica das articulações. Para isso, a ampola de raio-x foi colocada paralelamente ao eixo longitudinal do cavalo centrando as respetivas estruturas articulares consoante o tipo de projeção. O critério de seleção das imagens no estudo descrito baseou-se na escolha das projeções que permitiram identificar e caracterizar melhor as lesões. As imagens radiográficas foram obtidas através dos sistemas de radiologia digital EXAMION® e Vieworks da EPHS e foram analisadas detalhadamente atribuindo-se uma pontuação segundo o sistema de classificação dos achados radiológicos (Tabela 4)<sup>128</sup>.

Tabela 4 - Sistema de classificação radiográfica. (Adaptado de <sup>128</sup>)

GRAU	Achados radiográficos
0	Margens articulares arredondadas e esclerose subcondral ausente.
1	Variação anatómica <u>sem</u> significado clínico. Margens articulares pontiagudas ou esclerose óssea subcondral localizada mínima. Alterações ligeiras (depressão, achatamento) da tróclea. Ossos tarsais proeminentes.
2	Osteófitos ou entesófitos <u>ligeiros</u> . Remodelação óssea e/ou esclerose subcondral ligeira e localizada. Perda de espaço articular.
3	Osteófitos ou entesófitos <u>moderados</u> . Remodelação óssea, lucências, esclerose subcondral moderada e localizada e/ou redução do espaço articular.
4	Osteófitos ou entesófitos <u>severos</u> . Remodelação óssea, lucências, esclerose subcondral severa e redução de espaço articular evidente.

### 4.3.3 Análise estatística

Os dados foram organizados de forma sistemática por intermédio do programa Microsoft Excel e a análise estatística foi realizada com recurso ao programa IBM SPSS (versão 28.0). Face à natureza qualitativa ou quantitativa discreta das variáveis em estudo,

a análise descritiva foi apresentada sob a forma tabelar ou gráfica e assente em frequências absolutas e relativas. Devido às características qualitativas das variáveis dependentes consideradas, a análise inferencial estatística baseou-se em metodologias não paramétricas. A correlação entre duas variáveis de tipo qualitativo ordinal foi avaliada através da correlação de *Spearman*. Na análise de duas amostras independentes com uma variável de natureza ordinal, utilizou-se o teste de *Mann-Whitney* para comparar as respectivas distribuições e no caso de serem três amostras independentes, aplicou-se o teste de *Kruskal-Wallis*. A associação entre categorias de variáveis qualitativas foi efetuada através do teste de qui-quadrado. Quando as condições para a sua validação não foram satisfeitas (menos de 20% de frequências esperadas inferiores a cinco e nenhuma frequência esperada inferior a um), utilizou-se a significância do teste exato de *Fisher-Freeman-Halton*. Foi ainda realizado o teste de proporções para análise de diferenças a este nível. Um valor  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Sempre que não existiam dados disponíveis para qualquer uma das variáveis em estudo, esta foi categorizada como “sem dados”. Os testes estatísticos realizados encontram-se detalhados no anexo 2.

#### **4.4 Resultados**

##### **4.4.1 Análise descritiva: caracterização da população (idade, sexo, raça, disciplina)**

A amostra populacional foi composta por 21 cavalos, sendo 19 do Alentejo, um do Centro e um do Norte, com idades compreendidas entre um e 14 anos, apresentando uma média de idades de 7,14 anos e um desvio padrão (DP) de 3,82. O intervalo de idades entre um e cinco anos apresentou o maior número de animais ( $n=9$ , 43%), no entanto a idade mais frequente entre os indivíduos foi de 12 anos, a qual se deteve por 23,8% dos equinos. No que respeita à categorização da amostra populacional por sexo, a amostra foi integrada maioritariamente por machos, dos quais 15 garanhões e dois machos castrados. Relativamente à raça e disciplina, os valores são idênticos, pelo que a maioria dos cavalos eram da raça Puro Sangue Lusitano e praticantes da disciplina de dressage. Os dados descritivos da caracterização da população encontram-se detalhados na tabela 5.

Tabela 5 - Caracterização da amostra populacional (n=21).

	n	%
<b>Sexo</b>		
Macho	17	81,0
Fêmea	4	19,0
<b>Raça</b>		
PSL	19	90,5
Cruzado Português	1	4,8
Português de desporto	1	4,8
<b>Disciplina</b>		
Dressage	19	90,5
Obstáculos	1	4,8
Lazer	1	4,8

#### 4.4.2 Análise descritiva: dados antes do tratamento IA com APS

Dos 21 equinos da amostra, a maioria de 57,1% apresentaram uma articulação com lesão, enquanto 38,1% apresentaram duas articulações com lesão e 4,8% revelaram três articulações com lesão. Neste contexto, foram alvo de análise um total de 31 articulações com lesões. O gráfico 1 ilustra os valores numéricos e percentuais relativos à localização das lesões articulares por membro.

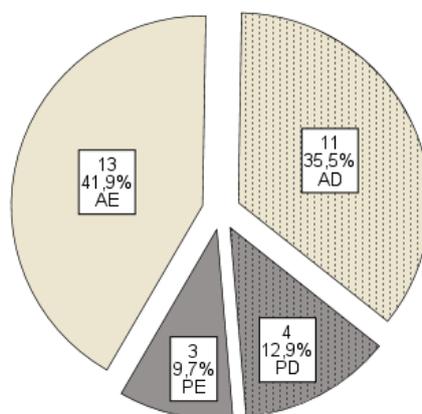


Gráfico 1 - Localização das articulações com lesões por membro (n=31).

Nesta amostra é perceptível que as lesões articulares ocorreram com mais frequência nos membros anteriores, representando um total de 77,4% das articulações registadas.

A análise das articulações com lesões tratadas por membro e por equino, verificou que 38,1% dos equinos apresentaram articulações com lesões em ambos os membros anteriores (AE e AD), enquanto 23,8% somente revelaram alterações no membro AE e

14,3% apenas em articulações do membro AD. Relativamente aos membros posteriores, 19,0% dos equinos apresentaram alterações articulares no membro PD e 4,8% dos equinos apresentaram somente três articulações com lesões no membro PE, que para efeitos clínicos conclusivos não podem ser individualizadas.

Relativamente aos 38,1% dos equinos que apresentaram duas lesões articulares em simultâneo, todas se localizavam nos membros anteriores, do mesmo modo que as três articulações com lesões localizadas no membro PE corresponderam ao mesmo equino.

**Estrutura sinovial:** O gráfico 2 ilustra discriminadamente a localização das lesões por estrutura sinovial.

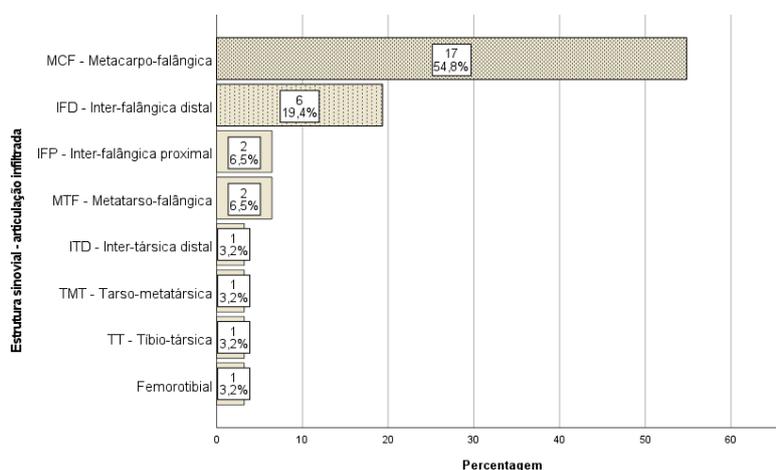


Gráfico 2 - Localização das lesões por estrutura sinovial (n=31).

Note-se que a maioria das lesões de OA ocorreram na estrutura sinovial MCF de elevada mobilidade, com um peso total de 54,8%, o que se traduziu igualmente na articulação mais frequentemente infiltrada de toda a amostra, com um total de 17 tratamentos. Os dados detalhados sobre as articulações estudadas e os respetivos membros encontram-se na tabela 7 (anexo 1).

**Grau de claudicação (escala AAEP)** - Observou-se que somente 6,5% das articulações não apresentaram claudicação e que a maioria de 77,4% apresentou uma claudicação ligeira, sendo em 29,0% de grau 1/5 e em 48,4% de grau 2/5. Somente 9,7% das articulações em estudo apresentaram uma claudicação moderada - grau 3/5 - e 6,5%

manifestaram claudicação severa - grau 4/5. Note-se que nenhuma articulação apresentou supressão de apoio, ou seja, grau 5/5 (Gráfico 3).

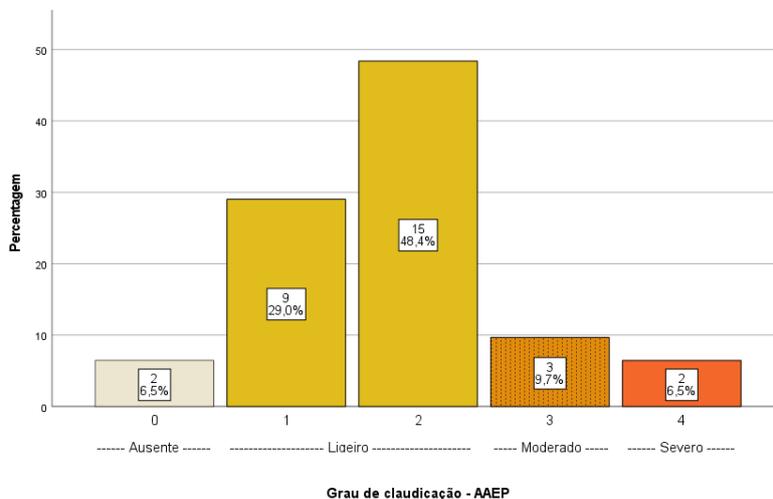


Gráfico 3 - Grau de claudicação respetivo às articulações em estudo (n=31).

**Dor à flexão passiva e flexão ativa** - No gráfico 4 abaixo, observou-se que em 54,8% das situações, as lesões não conduziram à expressão de dor à flexão passiva. Das situações sem dor à flexão passiva, 35,5% das articulações revelaram dor com a flexão ativa. Ressalta-se que em 6,5% das articulações não se procedeu à testagem de flexão ativa por ser um poldro. Por último, todas as lesões que revelaram dor à flexão passiva também conduziram a dor no teste de flexão ativa (45,2%).

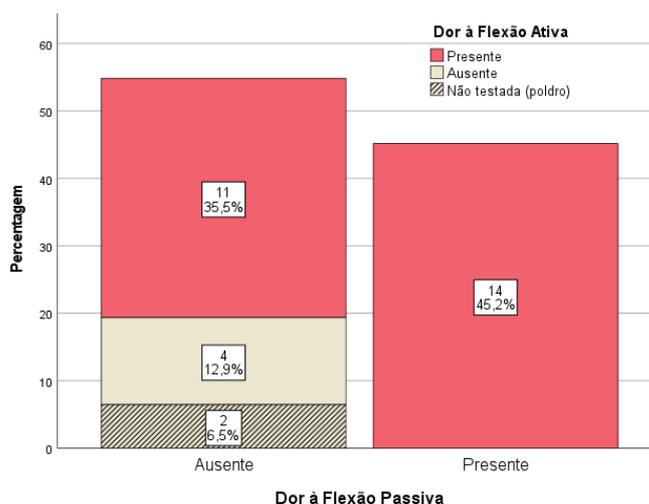


Gráfico 4 - Testes de dor à flexão passiva e de dor à flexão ativa respetivos às articulações em estudo (n=31).

**Grau de efusão articular** - Esta análise encontra-se ilustrada no gráfico 5 abaixo, tendo sido realizada para as 31 estruturas sinoviais em estudo.

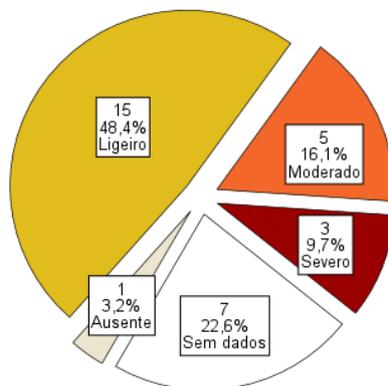


Gráfico 5 - Grau de efusão articular (n=31).

De um modo geral, é perceptível que o grau ligeiro de efusão articular constituiu a situação mais frequente, com um registo total de 48,4% das articulações. Note-se que não se dispõe de registo do grau de efusão de 22,6% das articulações.

**Grau radiográfico** - As situações mais frequentes foram as alterações ligeiras (grau 2) (Figura 28), constituindo mais de metade dos casos, o que correspondeu em termos percentuais a 54,8% das articulações, seguidas das alterações moderadas (grau 3) (Figura 29), que representam 22,6% dos casos. Das restantes, 6,5% corresponderam a variações de anatomia normal (grau 1) (Figura 27) e 12,9% não apresentaram alterações (Figura 26). Não se possui o registo do grau radiográfico de uma articulação, o que representa um total de 3,2%. Atente-se que não são mencionadas as alterações severas (grau 4), pois correspondem ao critério de exclusão deste estudo.

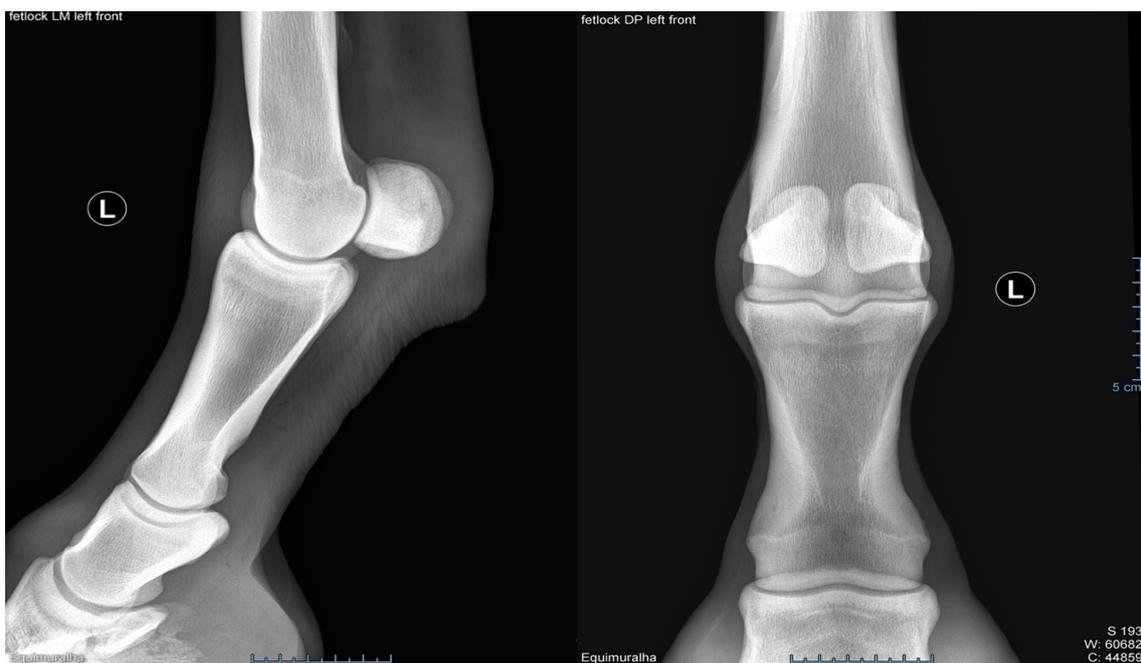


Figura 26 – Projeções radiográficas LM (esquerda) e DP (direita) da articulação MCF (MAE) correspondentes ao cavalo 15. **Grau radiográfico = 0.** (Imagens radiográficas cedidas pelo Dr. Tomé Fino)



Figura 27 – Projeções radiográficas DMPLO (esquerda) e DLPMO (direita) da articulação MCF (MAE) correspondentes ao cavalo 21. **Grau radiográfico = 1.** (Imagens radiográficas cedidas pelo Dr. Tomé Fino)



Figura 28 - Projeções radiográficas LM (esquerda) e DLPMO (direita) da articulação MCF (MAE) correspondentes ao cavalo 7. **Grau radiográfico = 2.** (Imagens radiográficas cedidas pelo Dr. Tomé Fino)



Figura 29 - Projeções radiográficas LM (esquerda) e DLPMO (direita) da articulação MCF (MAD) correspondentes ao cavalo 7. **Grau radiográfico = 3.** (Imagens radiográficas cedidas pelo Dr. Tomé Fino)

**Ecografia** - Os resultados da avaliação por ecografia indicaram que 19,4% das articulações não apresentaram alterações significativas, 9,7% revelaram exclusivamente sinovite, 3,2% exclusivamente capsulite e 9,7% sinovite e capsulite. Atente-se que não se dispõe de resultados ecográficos de 58,1% das articulações, o que representa mais de metade dos casos em estudo.

**Tratamento prévio** – No gráfico 6 abaixo, verificou-se que o tratamento anterior mais frequentemente utilizado foi a administração intra-articular de corticosteroides, aplicado em 61,3% das articulações. Em oposição, 25,8% das articulações não foram sujeitas a nenhum tratamento prévio.

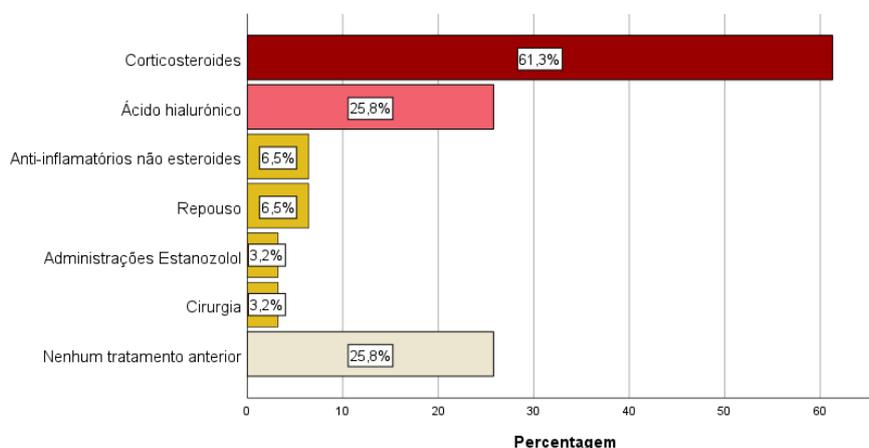


Gráfico 6 - Distribuição (%) dos casos com e sem tratamentos anteriores à APS (n=31).

De entre as articulações sujeitas a tratamentos anteriores, 45,2% foram submetidas a um tratamento prévio à infiltração com APS, enquanto que 25,8% foram sujeitas a dois tratamentos. Somente um (3,2%) caso clínico apresentou três tratamentos que antecederam a terapia intra-articular. Note-se que a maioria de 43,5% das articulações foram tratadas apenas com corticosteroides. No entanto é de salientar que todas as estruturas sinoviais submetidas a dois ou mais tratamentos da amostra, envolveram sempre tratamento com corticosteroides, complementados com AH (30,4%), com AINEs (4,3%) ou a associação de AH + AINEs (4,3%).

#### 4.4.3 Análise descritiva: dados após o tratamento IA com APS

**Reações adversas** - É importante salientar que neste estudo, não foram observadas quaisquer reações adversas secundárias à administração IA de APS.

**Resposta à terapia** - Os resultados encontram-se ilustrados no gráfico 7, onde é evidente que a grande maioria de 83,9% das articulações afetadas apresentaram uma resposta positiva à APS.

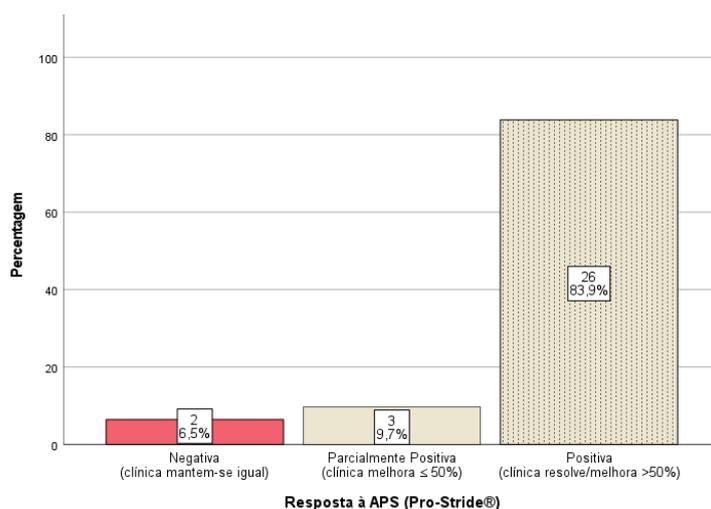


Gráfico 7 - Resposta clínica à APS (n=31).

**Necessidade de segunda administração** - De entre as articulações infiltradas, em 67,8% não foi necessária a segunda administração de APS. Dentro deste grupo, um equino apresentou lesões concomitantes subsequentes que interromperam o tratamento das duas articulações metacarpo-falângicas dos membros anteriores. Nas restantes 32,2% das articulações foi requerida uma segunda administração de APS. Destas, 29,0%, necessitaram de uma segunda administração a longo prazo, ocorrendo aproximadamente entre seis meses a um ano após a primeira infiltração, enquanto que 3,2% necessitaram de uma administração a curto prazo, que decorreu entre o primeiro e o sexto mês após o tratamento.

A análise da necessidade de uma segunda administração de APS com base na resposta à primeira infiltração encontra-se detalhada no gráfico 8.

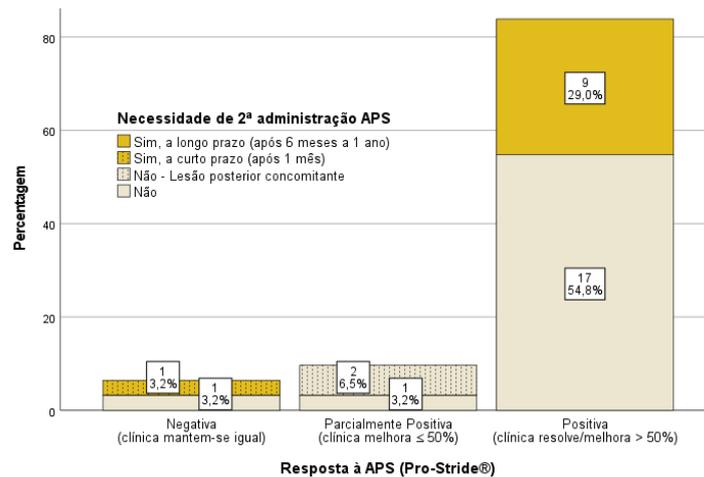


Gráfico 8 - Necessidade de 2ª administração de APS em função da resposta ao primeiro tratamento com APS (n=31).

#### 4.4.4 Testes estatísticos

##### a) Relação entre “grau radiográfico” e “grau de claudicação”:

Ao aplicar o Coeficiente de correlação de *Spearman* entre as variáveis: “grau radiográfico” e “grau de claudicação”, verificou-se que não existe uma relação direta ou indireta, estatisticamente significativa entre estes dois critérios, em que apesar de ter sido observada uma relação positiva, esta apresenta-se de baixa intensidade e não significativa ( $r_s=0,226$ ; valor  $p=0,229$ ). Na tentativa de avaliar se alguns graus radiográficos poderiam estar associados a alguns graus de claudicação foi aplicado o teste do qui-quadrado cujos resultados indicaram que o “grau radiográfico” é independente do “grau de claudicação” apresentado pelo equino, pelo que não existe uma associação significativa entre estes dois critérios ( $X^2_{(12)}=11,524$ ; valor  $p=0,242$ ). A tabela 8 (Anexo 2) sustenta os dados estatísticos descritos.

A análise comparativa da distribuição dos “graus radiográficos” por “grau de claudicação” revelou que a proporção de equinos com lesões de grau radiográfico ligeiro (grau 2) foi significativamente maior nos equinos com graus de claudicação 0/5 (100,0%), 1/5 (77,8%) e 4/5 (100,0%), do que nos equinos com grau de claudicação 3/5 (0,0%). Da mesma forma, a proporção de equinos com lesões radiográficas moderadas (grau 3) foi significativamente maior nos equinos que apresentaram grau de claudicação 3/5 (66,7%) do que nos equinos com grau de claudicação 1/5 (0,0%).

b) Relação entre “grau radiográfico” e presença/ausência de “dor à flexão passiva” / “dor à flexão ativa”:

Os resultados do teste não paramétrico de *Mann-Whitney* revelaram que não existem diferenças estatisticamente significativas entre equinos com (MR=17,19) e sem (MR=14,21) presença de dor à FP (IU=88,500; valor  $p=0,28$ ), bem como entre equinos com (MR=14,58) e sem (MR=14,00) presença de dor à FA (IU=46,000; valor  $p=0,920$ ). Não existem evidências de que o “grau radiográfico” possa depender da expressão de “dor à FP” e de “dor à FA”. A tabela 9 e os gráficos 13 e 14 (Anexo 2) sustentam os dados estatísticos descritos.

c) Relação entre “grau radiográfico” e “necessidade de segunda administração de APS”:

A análise estatística através da aplicação do teste de *Mann-Whitney* revelou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre equinos com (MR=17,30) e sem (MR=14,60) necessidade de segunda administração de APS (U=82,000; valor  $p=0,440$ ), pelo que não existem evidências de que haja algum grau de dependência entre as duas variáveis. A tabela 9 e o gráfico 15 (Anexo 2) sustentam os dados estatísticos descritos.

d) Relação entre “grau de claudicação” e “necessidade de segunda administração de APS”:

A distribuição do “grau de claudicação” em função da “necessidade de segunda administração de APS” encontra-se ilustrada no gráfico 9.

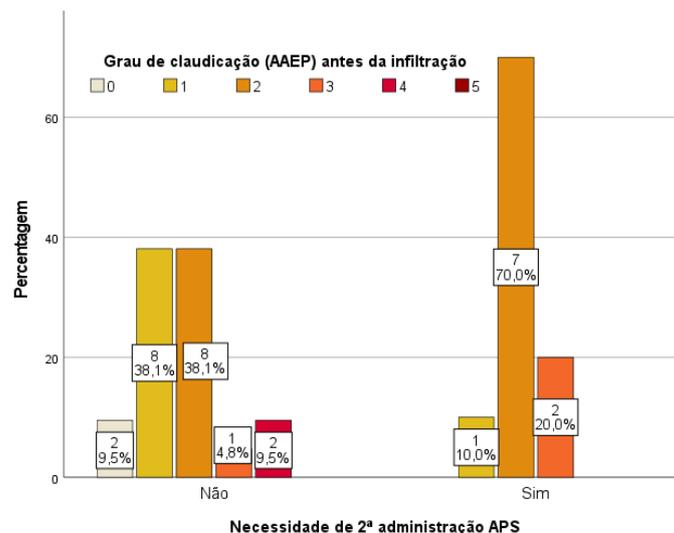


Gráfico 9 - Distribuição da variável "grau de claudicação" antes da primeira infiltração pela "necessidade de segunda administração de APS" (n=31).

A aplicação do teste não paramétrico de *Mann-Whitney* revelou que existem diferenças marginalmente significativas (valor  $p=0,05$ ) entre equinos sem (MR=14,29) e com (MR=19,60) necessidade de segunda administração de APS (U=69,000; valor  $p=0,050$ ), existindo assim evidências de que a necessidade de segunda administração de APS pode depender do maior grau de claudicação apresentado. A tabela 10 (Anexo 2) sustenta os dados estatísticos descritos.

e) Relação entre "resposta à APS" e "grau de claudicação":

A distribuição do "grau de claudicação" em função da "resposta à terapia" encontra-se esquematizada no gráfico 10.

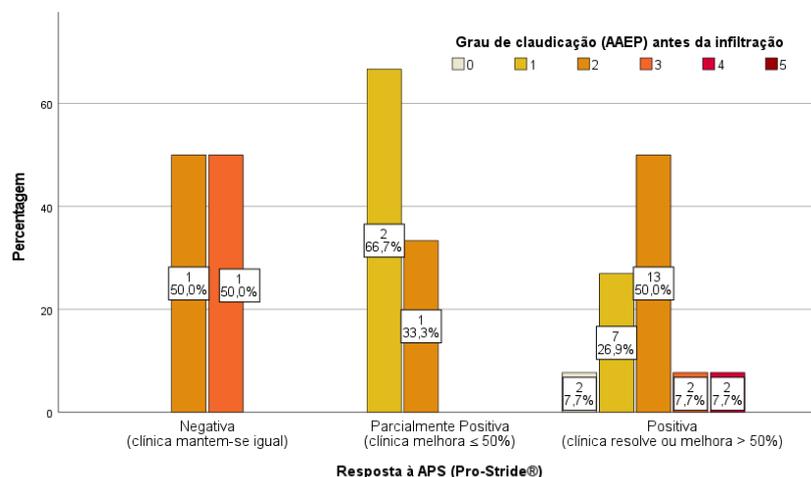


Gráfico 10 - Distribuição do "grau de claudicação" em função da "resposta à terapia" (n=31).

Os resultados do teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* revelaram que não existem diferenças estatisticamente significativas entre o “grau de claudicação” e as diferentes respostas à APS, nomeadamente, entre equinos com resposta negativa à APS (MR=23,50), com resposta parcialmente positiva (MR=11,00) e com resposta positiva (MR=16,00) ( $H_{(2)} = 2,632$ ; valor  $p = 0,247$ ). Concluindo, não existem evidências de que os diferentes graus de claudicação possam ter influência sobre as respostas clínicas resultantes da administração de APS. A tabela 11 (Anexo 2) sustenta os dados estatísticos descritos.

f) Relação entre “resposta à APS” e “grau radiográfico”:

A distribuição do “grau radiográfico” em função da “resposta à APS” encontra-se esquematizada no gráfico 11.

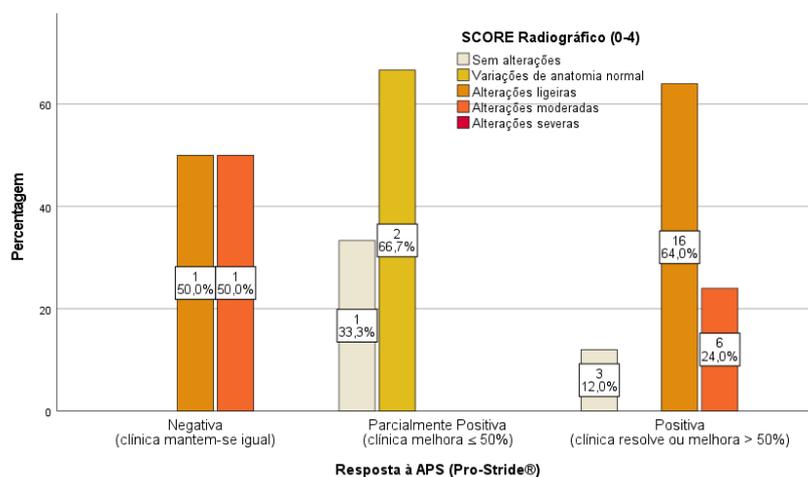


Gráfico 11 - Distribuição do "grau radiográfico" em função da "resposta à terapia" (n=31).

A aplicação do teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* revelou que existem diferenças estatisticamente significativas no “grau radiográfico” dos equinos em função das respostas apresentadas à APS ( $H_{(2)} = 7,111$ ; valor  $p = 0,019$ ). Os equinos com resposta positiva à APS (MR=16,38), apresentaram graus radiográficos significativamente superiores aos equinos com resposta parcialmente positiva à APS (MR=4,50). Contudo, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os graus radiográficos dos equinos com resposta negativa (MR=21,00) e parcialmente positiva (MR=4,50) e

entre os equinos com resposta negativa (MR=21,00) e positiva (MR=16,38). A tabela 12 (Anexo 2) sustenta os dados estatísticos descritos.

g) Relação entre “resposta à APS” e “grau de efusão clínica”:

A distribuição do “grau de efusão clínica” em função da “resposta à APS” encontra-se esquematizada no gráfico 12.

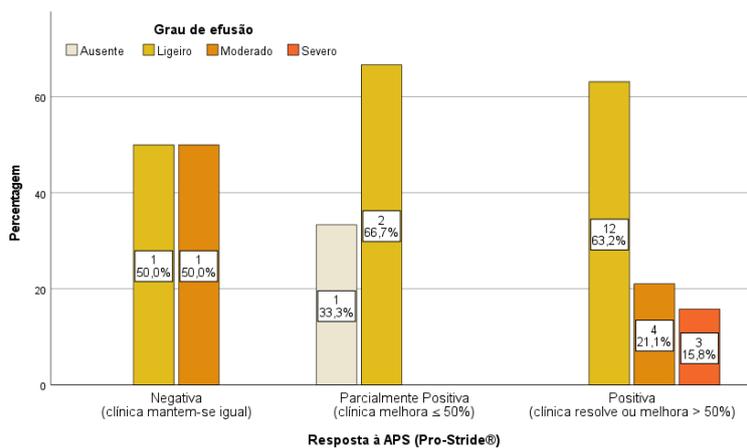


Gráfico 12 - Distribuição do "grau de efusão clínica" em função da "resposta à terapia" (n=31).

A análise estatística através do teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* revelou que não existem evidências estatisticamente significativas de que a resposta à APS possa ser influenciada pelos graus de efusão clínica apresentados pelos equinos. Em particular entre equinos com resposta negativa à APS (MR=14,00), com resposta parcialmente positiva (MR=6,33) e com resposta positiva (MR=13,32) ( $H_{(2)} = 3,518$ ; valor  $p = 0,183$ ). A tabela 13 (Anexo 2) sustenta os dados estatísticos descritos.

h) Relação entre a “resposta à APS e as variáveis: “dor à flexão passiva”, “dor à flexão ativa” e “grau de efusão clínica”:

A análise estatística mediante a aplicação do teste não paramétrico do qui-quadrado revelou que não existem evidências estatisticamente significativas de que a resposta à terapia com APS possa associar-se aos parâmetros: “dor à flexão passiva”, “dor à flexão ativa” e “grau de efusão clínica”. A tabela 14 (Anexo 2) sustenta as conclusões estatísticas descritas.

#### 4.5 Discussão

O presente estudo avaliou a aplicação do tratamento intra-articular com APS num total de 31 articulações em 21 equinos, o que indica que alguns animais foram infiltrados em mais do que uma articulação, ou no mesmo membro (exemplo: um indivíduo em três articulações do tarso) ou mais comumente, na mesma articulação do respetivo membro contralateral. Isto sublinha a elevada incidência de lesões articulares em simultâneo. Considerando que a grande maioria dos animais eram da raça Puro Sangue Lusitano, estes factos estão de acordo com os dados do estudo que avaliou a prevalência de lesões de OA em equinos desta raça e, que apresentou uma forte correlação entre a presença de lesões na mesma articulação do respetivo membro contralateral<sup>128</sup>. Em particular na amostra analisada, a totalidade dos equinos com lesões simultâneas na mesma articulação em ambos os membros contralaterais apresentaram as lesões nos membros anteriores. Somente um equino apresentou lesões em três articulações na região do curvilhão e que, invariavelmente, não puderam ser avaliadas clinicamente em separado devido à elevada proximidade e comunicação entre articulações.

A incidência de lesões osteoarticulares numa determinada articulação é influenciada por diversos fatores<sup>13</sup>. A OA da articulação metacarpo-falângica é muito frequente em cavalos de obstáculos devido à elevada carga que a articulação suporta durante a fase de impacto no solo, ao passo que as lesões nas articulações do tarso ocorrem mais regularmente em cavalos de dressage, uma vez que a prática desta modalidade envolve a transferência do centro de gravidade em sentido caudal com a conseqüente sobrecarga dos membros posteriores<sup>5,129</sup>. Sendo a maioria dos equinos da raça Puro Sangue Lusitano praticantes de dressage, seria esperado que as lesões ocorressem sobretudo nas articulações dos membros posteriores, porém a maioria das lesões de OA ocorreram na articulação metacarpo-falângica, o que pode estar relacionado com tipo de trabalho (guia, montado) que, quando repetido no tempo, produz distribuições assimétricas das cargas biomecânicas. Da mesma forma, no estudo de Ramos et al. (2020), as alterações radiográficas na articulação MCF constituíram os achados imagiológicos mais comuns dos membros anteriores, com grau radiográfico igual ou superior a 1<sup>128</sup>. Enquanto que no estudo de Ramos et al. (2020) as lesões na articulação TMT representaram o achado mais comum com a maior prevalência de alterações radiográficas mais severas (grau entre 3 e 4)<sup>128</sup>, este estudo apenas envolveu uma lesão

na TMT com alterações moderadas. Estes resultados podem dever-se ao facto de se tratar de uma amostra populacional reduzida com média de idades diferentes, em níveis e regimes de trabalho distintos.

Tendo em conta que a sobrecarga articular induz alterações nos condrócitos e secundariamente, alterações no aspeto e volume de líquido sinovial, este pode ser considerado como um meio indireto para avaliar o grau de inflamação<sup>2</sup>. Apesar de ter sido verificado o grau de efusão severo em duas articulações, estas apresentaram melhorias clínicas substanciais após a infiltração. O grau ligeiro de efusão articular foi o mais comum, tal como o achado radiográfico mais frequente foi a presença de osteófitos ligeiros. Em concreto, as lesões radiográficas ligeiras representaram a maioria significativa dos casos, seguidas das alterações moderadas. Quer isto dizer que o tratamento IA com APS foi aplicado predominantemente em articulações em fases ligeiras e moderadas de OA, conforme recomendado pela escassa bibliografia<sup>94,98</sup>. Na prática clínica, o diagnóstico de OA implica a associação entre os achados clínicos e imagiológicos. O exame radiográfico é normalmente o meio de diagnóstico mais utilizado para avaliar alterações ósseas articulares. Contudo, o seu valor diagnóstico é limitado, pois, muitas vezes não são detetadas as fases iniciais de OA, bem como as lesões da CA e de outros tecidos moles periarticulares<sup>5,128</sup>. Além disso, o mecanismo e o impacto da OA variam consoante o grau de mobilidade articular, de tal forma que os animais que manifestam claudicação nas articulações de elevada mobilidade (exemplo: MCP, MTP), muitas vezes apresentam sinais radiográficos subtis relacionados com a formação de osteófitos e lise óssea subcondral quando comparados com as articulações de mobilidade inferior (exemplo: ITD, TMT, IFP)<sup>128</sup>. Não obstante, Byam-Cook et al. (2009), Baccarin et al. (2012) e Ramos et al. (2020) corroboraram uma fraca correlação entre os achados radiográficos e os sinais clínicos de dor e claudicação (sobretudo nas lesões com graus inferiores ou iguais a 2)<sup>128,130,131</sup>, o que vai ao encontro com os resultados da análise das correlações entre as variáveis: “grau radiográfico” e “grau de claudicação”, em que se verificou que, apesar de existir uma relação positiva, esta é de baixa intensidade e não significativa; e entre o “grau radiográfico” e “presença/ausência de dor à FP e de dor à FA”, cujos resultados não evidenciaram uma relação de dependência entre as duas variáveis. Do mesmo modo, verificou-se que o “grau radiográfico” é independente do “grau de claudicação”. A distribuição do “grau radiográfico” por “grau de claudicação”

revelou que a proporção de equinos com alterações radiográficas ligeiras foi significativamente maior nos equinos com graus de claudicação 0/5 (100,0%), 1/5 (77,8%) e 4/5 (100,0%) do que nos equinos com grau de claudicação 3/5 (0,0%), o que indica que, ainda que se tratem de lesões ligeiras, o animal pode apresentar graus de claudicação variáveis desde ligeiros a severos, segundo a escala da AAEP – fraca correlação sobretudo nas lesões de grau inferior. Já a proporção de equinos com alterações moderadas foi significativamente maior nos equinos com grau 3/5 (66,7%) do que nos equinos com grau de claudicação 1/5 (0,0%), o que pode estar relacionado com o facto das lesões mais severas poderem estar associadas a graus de claudicação igualmente mais severos (correlação é “menos fraca” em lesões de graus superiores). Os sinais radiográficos ocorrem tardiamente no processo da doença, numa fase em que as lesões na cartilagem se tornam irreversíveis. Em contrapartida, a ultrassonografia fornece informações complementares ao exame radiográfico na medida em que, facultava sinais substancialmente mais precoces de doença articular, nomeadamente sinovite ligeira a severa e alterações subtis da cartilagem, com irregularidade focal ou difusa e discretos pontos hiperecogénicos<sup>32,132</sup>. As lesões do osso subcondral podem ser, por vezes, detetadas antes de se tornarem visíveis radiograficamente<sup>132</sup>. Além disso, a ultrassonografia pode ser considerada mais sensível comparativamente ao exame radiográfico, no que concerne à deteção da localização e do número de fragmentos osteocondrais<sup>132</sup>. Ainda que não se disponha de dados relativos a 58,1% das articulações avaliadas, pode verificar-se que as articulações com sinovite e/ou capsulite responderam de forma positiva à APS, o que constitui um dado relevante para a avaliação da eficácia do tratamento.

Não existe um tratamento “ideal” e único capaz de limitar a progressão da OA e de restaurar a homeostasia articular pelo que, aplicar dois ou mais tratamentos em simultâneo, numa tentativa de melhorar o prognóstico e aumentar as hipóteses de regresso ao nível de performance anterior ou semelhante é uma prática extremamente comum<sup>5</sup>. De entre as articulações alvo de análise, 23 articulações foram sujeitas a tratamentos anteriores cuja resposta não foi satisfatória, requerendo outras soluções. Neste grupo a administração IA de corticosteroides foi a abordagem terapêutica mais usada, seguida do AH aplicado por via IA e dos AINEs. Os restantes tratamentos mencionados no tópico “Resultados” foram aplicados em casos pontuais e relacionadas com a condição

individual de cada animal. Deve referir-se que as articulações sujeitas a dois ou mais tratamentos, envolveram sempre a associação de corticosteroides com AH e/ou AINEs. Estes resultados estão em conformidade com a literatura que afirma que na prática clínica, os corticosteroides são frequentemente usados como primeira abordagem perante o diagnóstico clínico de OA em articulações de elevada mobilidade, devido ao baixo custo associado e por controlarem sintomática e temporariamente a doença ao promover o alívio da dor e ao reduzir a inflamação<sup>99</sup>. Em relação à curta duração dos seus efeitos, Zhang et al. (2020) afirmou que pacientes com OA apresentaram melhorias ligeiras a moderadas num período de seis semanas após a administração, porém, após esse período, a melhoria dos sintomas foi pouco significativa<sup>55</sup>. Segundo Velloso et al. (2020), os produtos autólogos apresentaram efeitos condroprotetores ao regularem positivamente a expressão dos genes da MEC e reduziram significativamente a expressão da PGE<sub>2</sub> nos meios de cultura, contrariamente à triancinolona. Em particular, a APS produziu a redução dose-dependente mais eficaz deste mediador (PGE<sub>2</sub>), envolvido nos processos catabólicos da CA e de dor articular, de entre os três agentes<sup>99</sup>. Atendendo a estes dados, isto pode ser a justificação pela qual os equinos com OA melhoraram significativamente o grau de claudicação após o tratamento com APS<sup>99</sup>. Ainda que tenha sido usado AH conjugado com outros agentes anti-inflamatórios e, que a literatura tenha demonstrado que a adição de corticosteroides aos viscosuplementos tem potenciado uma melhor analgesia a curto prazo, a eficácia do AH para o tratamento da OA permanece controversa<sup>5,50</sup>. Por conseguinte, a APS pode ser preferida relativamente aos tratamentos convencionais, sobretudo, em casos não responsivos; em cavalos jovens, de modo a evitar o seu uso precoce e repetido e os seus efeitos adversos, prolongando os anos úteis de performance desportiva; quando os custos do tratamento não são um fator limitante para os proprietários e ainda, em competições visto que não é considerado *doping*<sup>15,103,104</sup>.

Note-se que neste estudo não foram observadas quaisquer reações adversas decorrentes da administração IA de APS, o que demonstra a segurança deste tratamento aplicado em diversas espécies, tal como enunciado por vários autores<sup>94,98,108</sup>.

O estudo prospetivo de Bertone et al. (2014) foi o primeiro ensaio clínico *in vivo* controlado realizado com o propósito de estudar a eficácia da APS em cavalos com OA<sup>98</sup>. Por sua vez, revelou que a administração IA de APS pode produzir efeitos SMOAD através da redução do grau de claudicação, simetria nos apoios e da melhoria da amplitude

de movimento articular sem sinais de dor associados, bem como através de análises do líquido sinovial normais de animais em regime protocolado de exercício. De facto, mostrou ser eficaz no tratamento do estado natural e crónico da OA<sup>98</sup>. Sendo o objetivo principal do presente estudo avaliar a eficácia da APS em equinos com OA, o foco deve centralizar-se na análise da variável “resposta à terapia” e na investigação de fatores que possam influenciá-la. Considerando que a maioria de 83,9% das articulações apresentaram uma resposta positiva e que somente duas articulações obtiveram uma resposta negativa ao tratamento, pode inferir-se que a APS apresentou elevada eficácia na melhoria dos sinais clínicos nesta amostragem. A melhoria clínica de até 50% caracterizada como resposta “parcialmente positiva” foi verificada em três articulações. De entre estas, um indivíduo cujo bloqueio intra-articular das duas articulações metacarpo-falângicas foi negativo e cuja melhoria foi mínima no bloqueio perineural dos quatro pontos baixos após responder positivamente em 60% ao bloqueio perineural do sesamoide abaxial do membro AE, optou-se por prosseguir para ressonância magnética, em que foi diagnosticada uma componente de dor óssea subcondral. No outro caso em que houve igualmente uma forte suspeita de dor óssea, sugeriu-se prosseguir para ressonância magnética, contudo, por motivos incontroláveis do ponto de vista económico e pessoal dos proprietários, não se possuem dados do seguimento posterior do paciente.

Atente-se que Bertone et al (2014), Kon et al. (2020) e Camargo et al. (2021) descreveram que a duração dos efeitos analgésicos e anti-inflamatórios da APS poderia ser superior a um ano<sup>94,98,108</sup>, contudo na prática, os reforços terapêuticos foram realizados conforme a necessidade dos animais tal como no estudo de King et al. (2021)<sup>102</sup>. Tais dados estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo que revelaram que os reforços à *posteriori* podem depender do grau de claudicação manifestado e logo, da necessidade de cada indivíduo. Curiosamente, todos os animais que foram tratados novamente com APS apresentaram graus de claudicação maioritariamente variáveis entre 2 e 3 e nunca inferiores a 1, segundo a escala da AAEP. As articulações que requereram uma administração à *posteriori* apresentaram um quadro clínico mais ligeiro sem agravamento dos sinais radiográficos comparativamente ao momento do primeiro tratamento. Este reforço a longo prazo pode ser justificado pelo carácter evolutivo da OA, pela variação do tempo de ação terapêutico entre animais, que é inerente ao facto de ser um produto autólogo, mas que também está associada à modalidade e ao nível de trabalho

de cada indivíduo<sup>13,108</sup>. Além disso, estes reforços podem ser influenciados pela disponibilidade financeira dos proprietários em maximizar os níveis de exercício, sobretudo em cavalos de competição. Veja-se em detalhe o caso respetivo ao cavalo “três” que apresentou grau de claudicação 3 antes do primeiro tratamento, dor à FA da articulação femorotibial, registo radiográfico dentro dos limites normais (grau 0), resposta clínica positiva à primeira infiltração e necessidade de reforços a longo prazo. Ainda que não houvesse alterações visíveis no exame radiográfico, à ecografia apresentou sinovite, espessamento da cápsula articular, irregularidade ligeira da cartilagem do côndilo medial, pequenos osteófitos no *plateau* medial da tíbia e suspeita de fissura na região axial e cranial do menisco medial. Estas alterações em conjunto com a suspeita da fissura podem justificar a necessidade de reforços a longo prazo, o que valida o resultado do teste estatístico que demonstrou não existir necessariamente uma relação entre o “grau radiográfico” e a “necessidade de segunda administração de APS”. Por outro lado, somente uma articulação foi tratada pela segunda vez a curto prazo (um mês) com o intuito de tentar potenciar a longevidade articular através do contacto com fatores de crescimento e da ação anti-inflamatória proporcionada pela APS. Todavia, a apresentação clínica deste caso incluiu: grau de claudicação moderado, registo radiográfico da MCF de grau moderado caracterizado por OA moderada a severa com sinais de esclerose, efusão, sinovite e capsulites severas e resposta refratária à administração de corticosteroides e AH. De facto, ainda que a articulação tenha sido tratada duas vezes com APS no período de um mês, a resposta foi negativa. Dado que este animal tinha um fragmento não diagnosticado em poldro e considerando o fator idade no momento do tratamento – 14 anos – é esperado naturalmente, uma fase avançada de OA com consequências secundárias do contacto do fragmento com a superfície articular, que podem ser as razões do fracasso do tratamento neste caso isolado. Estes resultados coincidem com Bertone et al. (2014) que descreveram uma resposta terapêutica significativamente mais eficaz à APS em casos que não apresentem sinais radiográficos moderados a severos de osteófitos marginais, esclerose subcondral e de redução do espaço articular<sup>98</sup>. Discriminadamente, também o poldro “13” com três anos de idade cuja articulação metatarso-falângica manifestou uma claudicação 2/5 e um grau radiográfico ligeiro não responsivo aos corticosteroides, com bloqueio intra-articular positivo, respondeu também de forma negativa à APS, o que sugere que a dor pudesse não ser totalmente articular. Em

seguimento, realizou ressonância magnética que veio confirmar uma componente de dor óssea subcondral. De acordo com Guangyi et al. (2013), o osso subcondral desempenha um papel crucial na patogenia da OA, manifestando tanto alterações na microarquitetura quanto histopatológicas (lesões medulares ósseas, microlesões, entre outras)<sup>7</sup>. Independentemente da origem, dada a intrínseca ligação entre a CA e o osso subcondral, é natural que a ocorrência de processos reativos e degenerativos em qualquer uma das estruturas, desde as fases mais iniciais da doença, resulte por conseguinte, em alterações na outra estrutura<sup>1</sup>. Todavia, sabe-se que a estimulação dos recetores ósseos acompanha frequentemente os movimentos articulares de extensão e flexão, originando elevações da pressão intramedular, sendo esta provavelmente uma fonte de dor articular em alguns cavalos<sup>2</sup>.

Não foram comprovadas evidências de que o “grau de claudicação” manifestado previamente ao tratamento possa ter influência sobre a “resposta à terapia”. Isto quer dizer que graus de claudicação mais elevados não originem necessariamente respostas clínicas negativas e vice-versa. Ora atente-se ao exemplo do caso “nove” com claudicação severa de grau 4/5, dor à FP e FA, efusão articular severa e lesões radiográficas ligeiras que revelaram não ter grande impacto, pois a articulação melhorou significativamente – sem dor à FP, FA, sem efusão, e passando a apresentar uma claudicação de grau 1/5 segundo a escala da AAEP.

Embora a APS se tenha demonstrado sobretudo benéfica e aplicada em grande parte, no seguimento de casos refratários aos corticosteroides, as melhorias pouco satisfatórias e as respostas negativas podem ser justificadas fortemente pelo carácter progressivo da OA, pela severidade das lesões, identificadas quer através dos meios de diagnóstico convencionais quer através de meios de diagnósticos avançados de imagem, como a ressonância magnética ou a tomografia computadorizada. A ressonância permite identificar alterações precoces e subtis da morfologia da CA – espessamento, volume, superfície articular - e dos tecidos moles, detetar outros sinais de lise e esclerose do osso subcondral e alterações na medula óssea, normalmente associadas a lesões da CA e à progressão da doença articular degenerativa<sup>5,133</sup>. É de notar que o estudo revelou que os equinos com resposta positiva apresentaram graus radiográficos significativamente superiores aos equinos com resposta parcialmente positiva à APS. O mesmo não se verificou entre os graus radiográficos de equinos com resposta negativa e parcialmente

positiva e entre os equinos com resposta negativa e positiva. Numa tentativa de interpretar estes dados, infere-se que estes resultados se possam dever ao elevado número de casos positivos com graus radiográficos variáveis entre 0 e 3 comparativamente ao número reduzido de animais pertencentes ao outro tipo de respostas, daí a significância estatística ser só notória no grupo de animais com resposta positiva. Neste sentido, assumir que os animais pertencentes ao grupo “resposta positiva” estão necessariamente associados a graus radiográficos mais elevados, é incorreto. Atendendo à reduzida amostragem em estudo, não houve diferença na resposta clínica dos animais com registos radiográficos de graus mais ou menos elevados, pelo que se pode assumir que os graus radiográficos não têm necessariamente influência na resposta à terapia. Isto denota que podem ser detetadas alterações radiográficas e mesmo assim, os animais melhorarem a resposta consideravelmente.

Contrariamente ao estudo de Bertone et al. (2014) que incluiu predominantemente cavalos com claudicação nos membros posteriores<sup>98</sup>, o presente estudo incluiu sobretudo cavalos com claudicação nos membros anteriores. Bertone et al. (2014) questionaram se o tipo de membros poderia estar associado com o tipo de resposta<sup>98</sup>. Ao supor esta questão, o elevado número de casos com claudicações dos membros anteriores com melhorias superiores a 50% aponta para a possibilidade de que o tipo de membros não influencia o prognóstico dos animais. Em termos práticos, a elevada incidência de infiltrações com APS nos membros anteriores pode estar relacionada com a necessidade de proteger a CA em articulações de elevada mobilidade (exemplo: MCF, MTF, IFD), evitando o uso de corticosteroides numa fase precoce da carreira desportiva dos equinos.

Aliando os factos científicos acima documentados aos resultados recolhidos retrospectivamente, pode concluir-se que a administração intra-articular de APS é eficaz e segura para o tratamento da OA em equinos. Contudo, existem várias limitações inerentes ao estudo realizado. Primeiramente, a análise retrospectiva da avaliação da eficácia e segurança da APS foi realizada no contexto clínico da empresa Equimuralha durante dois anos, incluindo cavalos particulares e um número elevado de casos que não ocorreram durante o estágio realizado pela aluna, o que impossibilitou a investigação de dados adicionais que poderiam ter enriquecido o trabalho (exemplo: aspeto macroscópico do líquido sinovial antes da APS, aspetos ecográficos). Assim sendo, a impossibilidade de obter determinados dados no seguimento dos casos inerente ao contexto clínico

dependente dos clientes e o facto de a amostra populacional estar restringida aos casos que foram surgindo até março de 2023, induziu falhas na obtenção da informação. De salientar que as articulações infiltradas no ano corrente podem requerer infiltrações a longo prazo que não serão incluídas e podem originar lapsos nas interpretações e respetivas conclusões. De seguida, o facto de não ser um estudo prospetivo e controlado, desprovido de um grupo de controlo (exemplo: tratamento com corticosteroides) impediu a comparação do ponto de vista prático, em contexto de ambulatório, da eficácia entre métodos convencionais e ortobiológicos. O tamanho reduzido da amostra torna as comparações e as conclusões suscetíveis a erros. Além disso, a avaliação da resposta não foi quantitativa, mas sim, baseada na avaliação dos clínicos e nas opiniões dos proprietários quando disponíveis, o que pode ter induzido conclusões tendencialmente pouco precisas. O tempo entre o tratamento e a reavaliação dos casos não foi padronizado, o que poderia ter aumentado a precisão das conclusões do ponto de vista comparativo (exemplo: reavaliação aos 14 dias). Atente-se que o facto de a APS ser um produto derivado do sangue do próprio animal faz com que seja esperada uma resposta clínica variável devido à variabilidade inerente da composição do tecido sanguíneo e do grau de patologia articular<sup>105,108</sup>. Nesta ótica, é impossível prever e comparar de forma absoluta a resposta de cada animal. A ênfase colocada em incluir todos os cavalos tratados por via IA com APS, originou outras condicionantes relacionadas com as diferentes articulações incluídas e que do ponto de vista crítico, afetam a comparação das articulações individualmente<sup>134</sup>.

Com o intuito de demonstrar que a APS é eficaz no tratamento da OA e que realmente pode alterar a progressão da doença relativamente a outras modalidades terapêuticas, seria interessante, no futuro, elaborar ensaios clínicos experimentais prospetivos controlados e padronizados (detalhes dos pacientes, modalidade, protocolo de exercício, tipo de articulação, membros, protocolos de tratamento e reavaliação homogéneos, avaliação quantitativa das respostas), que incluíssem um número considerável de animais e outros meios de diagnóstico mais sensíveis, como a ultrassonografia<sup>105,134,132</sup>. Considerando os vários fatores que influenciam a OA, são múltiplas as opções que permanecem por desenvolver. Por exemplo, a criação de um estudo semelhante ao de Bertone et al. (2014) que incluísse dois grupos: grupo APS e grupo controlo (corticosteroides) aplicados a equinos em fases semelhantes da doença

articular degenerativa. Além disso, o efeito condroprotetor da APS permanece indefinido pelo que a futura investigação é necessária para determinar o seu papel na melhoria quer da saúde da cartilagem, quer do processo de cicatrização da mesma, possivelmente através de ressonância magnética<sup>98</sup>. Ainda que inconcebível do ponto de vista prático e económico, conceber um estudo prospetivo controlado e experimental *in vivo*, que incluísse ressonância magnética e artroscopia ou ultrassonografia antes e depois do tratamento, com o financiamento de entidades clínicas ou de investigação interessadas e com o consentimento dos proprietários, seria extremamente proveitoso e enriquecedor para a medicina equina.

Em suma, será necessária uma avaliação exaustiva do animal antes e depois da administração da APS de maneira a fornecer fatores de prognóstico úteis em casos que possam beneficiar deste tratamento<sup>98</sup>. Esta avaliação deve incluir um exame locomotor detalhado da claudicação, análise objetiva do movimento, radiografias e quando possível, ecografias<sup>98,132</sup>. No entanto, uma vez que o tratamento é extremamente dispendioso, o fator monetário pode condicionar a sua aplicação.

#### **4.6 Conclusão**

A administração de APS tem sido estudada em cães, cavalos e no homem, contudo considerando a bibliografia consultada, este foi o primeiro estudo retrospectivo desenvolvido até hoje em equinos. Apesar das limitações e considerando as evidências descritas, este estudo conseguiu cumprir o objetivo principal ao demonstrar que a APS é eficaz e segura na prática clínica de equinos. Não obstante, deve ressaltar-se que, para além do sucesso em casos mais ligeiros de OA, a APS produziu melhorias clínicas significativas em animais com quadros clínicos de maior gravidade, nomeadamente de efusão moderada e severa, lesões de grau radiográfico moderado e registos ecográficos de sinovite e capsulite. Embora, em alguns casos, a APS não tenha produzido repostas positivas, que normalmente estão associadas a condições clínicas mais severas de OA e de dor além da articular, como a dor óssea subcondral. Os objetivos secundários de averiguar se existe uma relação entre a apresentação clínica (grau de claudicação, dor à FP e à FA) e radiológica foram cumpridos, bem como investigar a existência de relação entre cada uma destas e a resposta à terapia regenerativa e os fatores que possam influenciar a necessidade de segunda infiltração à *posteriori*. Ainda assim, a elaboração

de estudos com uma amostra populacional maior seria vantajosa para obter conclusões mais precisas.

A avaliação do tratamento intra-articular com APS contribuiu com informações úteis sobre a sua crescente aplicação em regime de ambulatório em Portugal, por ser uma opção altamente benéfica e segura em casos de diagnóstico precoce de OA de grau ligeiro a moderado, em alternativa aos corticosteroides. Assim, este tratamento emerge como uma ótima opção, especialmente quando a avaliação dos custos-benefícios o torna viável, e se pretende prolongar o desempenho desportivo dos equinos.

## Referências bibliográficas

1. Weeren R van. Chapter 1 - General Anatomy and Physiology of Joints. In: McIlwraith CW, Kawcak CE, Frisbie DD, eds. *Joint Disease in the Horse*. Second edition. Elsevier; 2016:1-20.
2. Caron JP. Chapter 61 - Arthritis. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2nd ed. Elsevier Saunders; 2011:655-668.
3. McIlwraith CW. Chapter 7 - Principles of Musculoskeletal Disease: Joint injuries and disease and osteoarthritis. In: Baxter GM, ed. *Adams and Stashak's Lameness in Horses*. 6th ed. Wiley-Blackwell; 2011:1705-1733.
4. de Grauw JC. Molecular monitoring of equine joint homeostasis. *Vet Q*. 2011;31(2):77-86. doi:10.1080/01652176.2011.565546
5. Baccarin RYA, Seidel SRT, Michelacci YM, Tokawa PKA, Oliveira TM. Osteoarthritis: a common disease that should be avoided in the athletic horse's life. *Anim Front*. 2022;12(3):25-36. doi:10.1093/af/vfac026
6. Murray RC, Smith RK, Henson FMD, Goodship A. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine carpal articular cartilage and its variation with exercise and cartilage deterioration. *The Veterinary Journal*, 162(2), 121-128 (2001). doi:<https://doi.org/10.1053/tvj.2001.0590>
7. Li G, Yin J, Gao J, et al. Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):223. doi:10.1186/ar4405
8. Walker PS, Dowson D, Longfield MD, Wright V. "Boosted lubrication" in synovial joints by fluid entrapment and enrichment. *Ann Rheum Dis*. 1968;27(6):512-520. doi:10.1136/ard.27.6.512
9. Antonacci JM, Schmidt TA, Serventi LA, et al. Effects of equine joint injury on boundary lubrication of articular cartilage by synovial fluid: Role of hyaluronan. *Arthritis Rheum*. 2012;64(9):2917-2926. doi:10.1002/art.34520
10. Torzilli PA, Hubbard RB, Pecorari IL. Squeeze-film properties of synovial fluid and hyaluronate-based viscosupplements. *Biomech Model Mechanobiol*. 2021;20(5):1919-1940. doi:10.1007/s10237-021-01485-x
11. van Weeren PR, Back W. Musculoskeletal Disease in Aged Horses and Its Management. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2016;32(2):229-247.

doi:10.1016/j.cveq.2016.04.003

12. Bertoni L, Jacquet-Guibon S, Branly T, et al. An experimentally induced osteoarthritis model in horses performed on both metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints: Technical, clinical, imaging, biochemical, macroscopic and microscopic characterization. Katz LM, ed. *PLOS ONE*. 2020;15(6):e0235251. doi:10.1371/journal.pone.0235251
13. Schlueter AE, Orth MW. Equine osteoarthritis: a brief review of the disease and its causes. *Equine Comp Exerc Physiol*. 2004;1(4):221-231. doi:10.1079/ECP200428
14. Stewart HL, Kawcak CE. The Importance of Subchondral Bone in the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Front Vet Sci*. 2018;5:178. doi:10.3389/fvets.2018.00178
15. Contino EK. Management and Rehabilitation of Joint Disease in Sport Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2018;34(2):345-358. doi:10.1016/j.cveq.2018.04.007
16. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):33-42. doi:10.1038/nrrheum.2010.196
17. McIlwraith C. From arthroscopy to gene therapy--30 years of looking in joints. Accessed April 8, 2023. <https://www.semanticscholar.org/me/library/all> Acedido a 08/04/2023.
18. McIlwraith CW. Chapter 3 - Traumatic Arthritis and Posttraumatic Osteoarthritis in the Horse. In: Frisbie DD, Kawcak CE, Weeren R van, eds. *Joint Disease in the Horse*. Second edition. Elsevier; 2016:33-44.
19. Mehana ESE, Khafaga AF, El-Blehi SS. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life Sci*. 2019;234:116786. doi:10.1016/j.lfs.2019.116786
20. Peffers MJ, Thornton DJ, Clegg PD. Characterization of neopeptides in equine articular cartilage degradation: NEOPEPTIDES IN EQUINE ARTICULAR CARTILAGE. *J Orthop Res*. 2016;34(1):106-120. doi:10.1002/jor.22963
21. Frisbie D, Donnell J. Use of firocoxib for the treatment of equine osteoarthritis. *Vet Med Res Rep*. Published online November 2014:159. doi:10.2147/VMRR.S70207
22. Smit Y, Marais HJ, Thompson PN, Mahne AT, Goddard A. Clinical findings, synovial fluid cytology and growth factor concentrations after intra-articular use of a

- platelet-rich product in horses with osteoarthritis. *J S Afr Vet Assoc.* 2019;90. doi:10.4102/jsava.v90i0.1721
23. Ortvad KF, Nixon AJ. Cell-based cartilage repair strategies in the horse. *Vet J.* 2016;208:1-12. doi:10.1016/j.tvjl.2015.10.027
  24. Chapter 3 - Anamnesis (History). In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse.* 2nd ed. Elsevier Saunders; 2011:9-15.
  25. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Jt Res.* 2012;1(11):297-309. doi:10.1302/2046-3758.111.2000132
  26. van Weeren PR, de Grauw JC. Pain in Osteoarthritis. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2010;26(3):619-642. doi:10.1016/j.cveq.2010.07.007
  27. Kawcak CE, Barrett MyraF. Chapter 21 - Fetlock. In: *Joint Disease in the Horse.* Second edition. Elsevier; 2016:302-317.
  28. Baxter GM, Stashak ST. Chapter 3 - Examination for lameness: History, visual exam, palpation, and manipulation. In: *Adams and Stashak's Lameness in Horses.* 6th ed. Wiley-Blackwell; 2011:227-372.
  29. LAMENESS EXAMS: Evaluating the Lam Horse | AAEP <https://aaep.org/horsehealth/lameness-exams-evaluating-lame-horse> Acedido a 12/04/2023.
  30. Mcilwraith W. Recent Advances in Diagnosis of Equine Joint Disease. Published online April 12, 2023.
  31. Frisbie DD, Werpy NM, Kawcak, C. E., Barret MF. Chapter 20 - Distal limb. In: *Joint Disease in the Horse.* Second edition. Elsevier; 2016:281-301.
  32. Cauvin ERJ, Smith RKW. Section 1: Musculoskeletal - Ultrasonography of the Fetlock. In: Frazer ML, ed. *Atlas of Equine Ultrasonography.* Second edition. John Wiley & Sons, Inc; 2022:49-84.
  33. Carstens A, Smith RKW. Section 1: Musculoskeletal - Ultrasonography of the Foot and Pastern. In: Frazer ML, ed. *Atlas of Equine Ultrasonography.* Second edition. John Wiley & Sons, Inc; 2022:25-48.
  34. Murray C. R, Dyson SJ. Chapter 21 - Magnetic Resonance Imaging. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse.* 2nd ed. Elsevier Saunders; 2011:239-245.
  35. Schramme M, Redding R. W. Chapter 4 - Diagnostic procedures: Magnetic

Resonance Imaging. In: *Adams and Stashak's Lameness in Horses*. 6th ed. Wiley-Blackwell; 2011:768-777.

36. Gardiner J. Nuclear Scintigraphy <https://www.vetmed.ucdavis.edu/hospital/diagnostic-imaging-services/nuclear-scintigraphy> Acedido a 12/04/2023.

37. Pease AP. Chapter 4 - Diagnostic procedures: Computed Tomography. In: Redding WR, ed. *Adams and Stashak's Lameness in Horses*. 6th ed. Wiley-Blackwell; 2011:834-838.

38. Puchalski M. S. Chapter 20 - Computed Tomography. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2nd ed. Elsevier Saunders; 2011:234-239.

39. Ley CJ, Ekman S, Dahlberg LE, Björnsdóttir S, Hansson K. Evaluation of osteochondral sample collection guided by computed tomography and magnetic resonance imaging for early detection of osteoarthritis in centrodistal joints of young Icelandic horses. *Am J Vet Res*. 2013;74(6):874-887. doi:10.2460/ajvr.74.6.874

40. MacIlwraith CW. Chapter 1 - Introduction. In: *Diagnostic and Surgical Arthroscopy in the Horse*. Fourth edition. Mosby Elsevier; 2015:1-3.

41. Ross MW. Chapter 23 - Arthroscopic Examination. In: *Adams and Stashak's Lameness in Horses*. 6th ed. Wiley-Blackwell; 2011:251-259.

42. Richardson DW, Dyson SJ. Chapter 36 - The Metacarpophalangeal Joint. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2nd ed. Elsevier Saunders; 2011:397-398.

43. Forsyth S. Equine synovial fluid analysis. Published online March 2018.

44. McIlwraith CW, Frisbie DD. Chapter 11 - Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. In: *Joint Disease in the Horse*. Second edition. Elsevier; 2016:192-201.

45. Frisbie DD. Chapter 62 - Markers of Osteoarthritis: Implications for Early Diagnosis and Monitoring of the Pathological Course and Effects of Therapy. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2nd ed. Elsevier Saunders; 2011:669-671.

46. Ma T wen, Li Y, Wang G ying, et al. Changes in synovial fluid biomarkers after experimental equine osteoarthritis. *J Vet Res*. 2017;61(4):503-508. doi:10.1515/jvetres-2017-0056

47. Contino EK. Management and Rehabilitation of Joint Disease in Sport Horses.

- Vet Clin North Am Equine Pract.* 2018;34(2):345-358. doi:10.1016/j.cveq.2018.04.007
48. Bookbinder L, Prisk A. Updates on Diagnosis and Management of Colic in the Field and Criteria for Referral. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2023;39(2):175-195. doi:10.1016/j.cveq.2023.03.001
49. Knottenbelt DC, Malalana F. Part 3: Index of drugs used in equine medicine. Section 6: Hormones/steroids and non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: *Saunders Equine Formulary*. Second edition. Saunders; 2015:141-160.
50. Pontes-Quero GM, García-Fernández L, Aguilar MR, San Román J, Pérez Cano J, Vázquez-Lasa B. Active viscosupplements for osteoarthritis treatment. *Semin Arthritis Rheum.* 2019;49(2):171-183. doi:10.1016/j.semarthrit.2019.02.008
51. McIlwraith CW. Chapter 12 - Intraarticular corticosteroids. In: *Joint Disease in the Horse*. Second edition. Elsevier; 2016:202-214.
52. Harkins JD, Carney JM, Tobin T. Clinical Use and Characteristics of the Corticosteroids. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1993;9(3):543-562. doi:10.1016/S0749-0739(17)30385-1
53. Clean Sport for Horses - FEI Prohibited Substances List | List of detection times. Accessed July 5, 2023. <https://inside.fei.org/fei/cleansport/ad-h/prohibited-list> Acedido a 05/07/2023
54. McILWRAITH CW. The use of intra-articular corticosteroids in the horse: What is known on a scientific basis?: Corticosteroids in the horse. *Equine Vet J.* 2010;42(6):563-571. doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00095.x
55. Zhang Y, Chen X, Tong Y, Luo J, Bi Q. Development and Prospect of Intra-Articular Injection in the Treatment of Osteoarthritis: A Review. *J Pain Res.* 2020;Volume 13:1941-1955. doi:10.2147/JPR.S260878
56. Frisbie DD. Hyaluronan. In: *Joint Disease in the Horse*. Second edition. Elsevier; 2016:215-219.
57. McIlwraith CW. Management of Joint Disease in the Sport Horse. *17th Proc 2010 Ky Res Nutr Conf April 26-27 2010*. Published online 2010.
58. Follow a 1-4-7 series for optimal results. | Adequan® i.m. <https://www.adequan.com/Dosing-and-Administration> Acedido em 20/04/2023.
59. McIlwraith CW. Chapter 14 - Polysulfated Glycosaminoglycan (Adequan®). In: *Joint Disease in the Horse*. Second edition. Elsevier; 2016:220-223.

60. Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW, Werpy NM. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res.* 2009;70(2):203-209. doi:10.2460/ajvr.70.2.203
61. Frisbie DD, McIlwraith CW, Kawcak CE, Werpy NM. Evaluation of intra-articular hyaluronan, sodium chondroitin sulfate and N-acetyl-d-glucosamine combination versus saline (0.9% NaCl) for osteoarthritis using an equine model. *Vet J.* 2013;197(3):824-829. doi:10.1016/j.tvjl.2013.05.033
62. Kramer C, Tsang A, Koenig T, Jeffcott L, Dart C, Dart A. Survey of the therapeutic approach and efficacy of pentosan polysulfate for the prevention and treatment of equine osteoarthritis in veterinary practice in Australia. *Aust Vet J.* 2014;92(12):482-487. doi:10.1111/avj.12266
63. McIlwraith CW. Chapter 15 - Pentosan Polysulfate. In: *Joint Disease in the Horse*. Second edition. Elsevier; 2016:224-228.
64. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. Evaluation of intramuscularly administered sodium pentosan polysulfate for treatment of experimentally induced osteoarthritis in horses. *Am J Vet Res.* 2012;73(5):628-633. doi:10.2460/ajvr.73.5.628
65. Soto SA, Chiappe Barbará A. Bisphosphonates: Pharmacology and Clinical Approach to Their Use in Equine Osteoarticular Diseases. *J Equine Vet Sci.* 2014;34(6):727-737. doi:10.1016/j.jevs.2014.01.009
66. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates Stimulate Formation of Osteoblast Precursors and Mineralized Nodules in Murine and Human Bone Marrow Cultures In Vitro and Promote Early Osteoblastogenesis in Young and Aged Mice In Vivo. *Bone.* 1998;22(5):455-461. doi:10.1016/S8756-3282(98)00033-7
67. Delguste C, Amory H, Doucet M, et al. Pharmacological effects of tiludronate in horses after long-term immobilization. *Bone.* 2007;41(3):414-421. doi:10.1016/j.bone.2007.05.005
68. Ammann P, Rizzoli R, Caverzasio J, Shigematsu T, Slosman D, Bonjour JP. Effects of the bisphosphonate tiludronate on bone resorption, calcium balance, and bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 2009;8(12):1491-1498. doi:10.1002/jbmr.5650081212

69. Gough MR, Thibaud D, Smith RKW. Tiludronate infusion in the treatment of bone spavin: A double blind placebo-controlled trial: Tiludron spavin trial. *Equine Vet J.* 2010;42(5):381-387. doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00120.x
70. Sotelo E, Vendruscolo C, Fülber J, et al. Effects of Joint Lavage with Dimethylsulfoxide on LPS-Induced Synovitis in Horses—Clinical and Laboratorial Aspects. *Vet Sci.* 2020;7(2):57. doi:10.3390/vetsci7020057
71. Vervuert I, Stratton-Phelps M. The Safety and Efficacy in Horses of Certain Nutraceuticals that Claim to Have Health Benefits. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2021;37(1):207-222. doi:10.1016/j.cveq.2020.11.002
72. Tnibar A, Schougaard H, Camitz L, et al. An international multi-centre prospective study on the efficacy of an intraarticular polyacrylamide hydrogel in horses with osteoarthritis: a 24 months follow-up. *Acta Vet Scand.* 2015;57(1):20. doi:10.1186/s13028-015-0110-6
73. Da Silva Xavier AA, Da Rosa PP, De Brum Mackmill L, Roll VFB. An assessment of the effectiveness of hyaluronic acid and polyacrylamide hydrogel in horses with osteoarthritis: Systematic review and network meta-analysis. *Res Vet Sci.* 2021;134:42-50. doi:10.1016/j.rvsc.2020.11.013
74. McClure SR, Wang C. A Preliminary Field Trial Evaluating the Efficacy of 4% Polyacrylamide Hydrogel in Horses With Osteoarthritis. *J Equine Vet Sci.* 2017;54:98-102. doi:10.1016/j.jevs.2017.02.019
75. Zayed M, Adair S, Ursini T, Schumacher J, Misk N, Dhar M. Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse. *Res Vet Sci.* 2018;118:317-323. doi:10.1016/j.rvsc.2018.03.011
76. McIlwraith CW. Chapter 63 - Gene Therapy. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse.* 2nd ed. Elsevier Saunders; 2011:671-673.
77. Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum.* 1996;39(9):1535-1544. doi:10.1002/art.1780390914
78. Frisbie D, Ghivizzani S, Robbins P, Evans C, McIlwraith C. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther.* 2002;9(1):12-20. doi:10.1038/sj.gt.3301608

79. Ortvad K. Regenerative Medicine in the Equine Athlete. Published online 2017.
80. Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res.* 2007;68(3):290-296. doi:10.2460/ajvr.68.3.290
81. Textor J. Autologous Biologic Treatment for Equine Musculoskeletal Injuries: Platelet-Rich Plasma and IL-1 Receptor Antagonist Protein. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2011;27(2):275-298. doi:10.1016/j.cveq.2011.05.001
82. Boffa A, Salerno M, Merli G, et al. Platelet-rich plasma injections induce disease-modifying effects in the treatment of osteoarthritis in animal models. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2021;29(12):4100-4121. doi:10.1007/s00167-021-06659-9
83. Garbin LC, Olver CS. Platelet-Rich Products and Their Application to Osteoarthritis. *J Equine Vet Sci.* 2020;86:102820. doi:10.1016/j.jevs.2019.102820
84. Haussler KK, King MR. Chapter 18 - Physical Rehabilitation. In: *Joint Disease in the Horse*. Second edition. Elsevier; 2016:243-269.
85. Oosterlinck M, Dumoulin M, Weishaupt MA. Evidence-based shoeing for orthopaedic pathologies: biomechanical basics of therapeutic farriery. In 26th Annual scientific meeting of the European College of Veterinary Surgeons (ECVS). Published online 2017.
86. Parks AH. Therapeutic Farriery. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2012;28(2):333-350. doi:10.1016/j.cveq.2012.05.003
87. Kon E, Engebretsen L, Verdonk P, Nehrer S, Filardo G. Clinical Outcomes of Knee Osteoarthritis Treated With an Autologous Protein Solution Injection: A 1-Year Pilot Double-Blinded Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med.* 2018;46(1):171-180. doi:10.1177/0363546517732734
88. Ajrawat P, Dwyer T, Chahal J. Autologous Interleukin 1 Receptor Antagonist Blood-Derived Products for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 2019;35(7):2211-2221. doi:10.1016/j.arthro.2018.12.035
89. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part I: Critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(9):981-1000. doi:10.1016/j.joca.2007.06.014

90. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(2):137-162. doi:10.1016/j.joca.2007.12.013
91. Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(4):476-499. doi:10.1016/j.joca.2010.01.013
92. Bin Abd Razak HR, Chew D, Kazezian Z, Bull AMJ. Autologous protein solution: a promising solution for osteoarthritis? *EFORT Open Rev*. 2021;6(9):716-726. doi:10.1302/2058-5241.6.200040
93. Linardi RL, Dodson ME, Moss KL, King WJ, Orved KF. The Effect of Autologous Protein Solution on the Inflammatory Cascade in Stimulated Equine Chondrocytes. *Front Vet Sci*. 2019;6:64. doi:10.3389/fvets.2019.00064
94. Kon E, Engebretsen L, Verdonk P, Nehrer S, Filardo G. Autologous Protein Solution Injections for the Treatment of Knee Osteoarthritis: 3-Year Results. *Am J Sports Med*. 2020;48(11):2703-2710. doi:10.1177/0363546520944891
95. Velloso Alvarez A, Boone LH, Braim AP, et al. A Survey of Clinical Usage of Non-steroidal Intra-Articular Therapeutics by Equine Practitioners. *Front Vet Sci*. 2020;7:579967. doi:10.3389/fvets.2020.579967
96. Muir SM, Reisbig N, Baria M, Kaeding C, Bertone AL. The Concentration of Plasma Provides Additional Bioactive Proteins in Platelet and Autologous Protein Solutions. *Am J Sports Med*. 2019;47(8):1955-1963. doi:10.1177/0363546519849671
97. Zoetis United States - ProStride® APS Autologous protein solution device. <https://www.zoetisus.com/products/horses/equine-regenerative-medicine/pro-stride-aps> Acedido a 18/04/2023.
98. Bertone AL, Ishihara A, Zekas LJ, et al. Evaluation of a single intra-articular injection of autologous protein solution for treatment of osteoarthritis in horses. *Am J Vet Res*. 2014;75(2):141-151. doi:10.2460/ajvr.75.2.141
99. Velloso Alvarez A, Boone LH, Pondugula SR, Caldwell F, Wooldridge AA. Effects of Autologous Conditioned Serum, Autologous Protein Solution, and Triamcinolone on Inflammatory and Catabolic Gene Expression in Equine Cartilage and

Synovial Explants Treated With IL-1 $\beta$  in Co-culture. *Front Vet Sci.* 2020;7:323. doi:10.3389/fvets.2020.00323

100. Total Equine Veterinary Associates. Beyond Steroids: Better Choices for Joint Treatments from TEVA - Part 3:Pro-Stride® APS <https://www.totalequinevets.com/client-center/resources/TEVApedia/beyond-steroids-better-choices-joint-treatments-teva#Part-3> Acedido em 12/06/2023.

101. Kuwasawa A, Okazaki K, Noda K, Nihei K. Clinical results of autologous protein solution injection for knee osteoarthritis with severe disease grade is inferior to mild or moderate grade. *Sci Rep.* 2023;13(1):6404. doi:10.1038/s41598-023-33659-1

102. King W, Cawood K, Bookmiller M. The Use of Autologous Protein Solution (Pro-Stride®) and Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma (Restigen®) in Canine Medicine. *Vet Med Res Rep.* 2021;Volume 12:53-65. doi:10.2147/VMRR.S286913

103. Northwest Veterinary Clinic Mount Vernon - Regenerative Therapy (Pro-Stride). <https://www.nwvetmountvernon.com/site/equine-veterinary-mount-vernon/regenerative-therapy-pro-stride> Acedido a 12/06/2023.

104. FEI - Fédération Équestre Internationale. Veterinary regulations 2023. <https://inside.fei.org/> Acedido em 14/06/2023.

105. O'Shaughnessey K, Matuska A, Hoepfner J, et al. Autologous protein solution prepared from the blood of osteoarthritic patients contains an enhanced profile of anti-inflammatory cytokines and anabolic growth factors: CYTOKINES IN NEW AUTOLOGOUS PRODUCT. *J Orthop Res.* 2014;32(10):1349-1355. doi:10.1002/jor.22671

106. King W, Woodell-May J. Comparison of the cellular and cytokine concentrations in the output of the autologous protein solution, orthokine, and onocomed 2 device systems. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22:S484. doi:10.1016/j.joca.2014.02.919

107. Rutgers M, Saris DB, Dhert WJ, Creemers LB. Cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis, in vitro effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):R114. doi:10.1186/ar3050

108. Camargo Garbin L, Morris MJ. A Comparative Review of Autologous Conditioned Serum and Autologous Protein Solution for Treatment of Osteoarthritis in Horses. *Front Vet Sci.* 2021;8:602978. doi:10.3389/fvets.2021.602978

109. Hix J, Klaassen M, Foreman R, et al. An Autologous Anti-Inflammatory Protein Solution Yielded a Favorable Safety Profile and Significant Pain Relief in an Open-Label Pilot Study of Patients with Osteoarthritis. *BioResearch Open Access*. 2017;6(1):151-158. doi:10.1089/biores.2017.0027
110. Granowitz EV, Clark BD, Mancilla J, Dinarello CA. Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. *J Biol Chem*. 1991;266(22):14147-14150.
111. King W, Van Der Weegen W, Van Drumpt R, Soons H, Toler K, Woodell-May J. White blood cell concentration correlates with increased concentrations of IL-1ra and improvement in WOMAC pain scores in an open-label safety study of autologous protein solution. *J Exp Orthop*. 2016;3(1):9. doi:10.1186/s40634-016-0043-7
112. Kaneko S, Satoh T, Chiba J, Ju C, Inoue K, Kagawa J. Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines Cell Mol Ther*. 2000;6(2):71-79. doi:10.1080/13684730050515796
113. Svala E, Thorfve AI, Ley C, et al. Effects of interleukin-6 and interleukin-1 $\beta$  on expression of growth differentiation factor-5 and Wnt signaling pathway genes in equine chondrocytes. *Am J Vet Res*. 2014;75(2):132-140. doi:10.2460/ajvr.75.2.132
114. Ley C, Svala E, Nilton A, et al. Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 on cartilage matrix metabolism in three-dimensional equine chondrocyte cultures. *Connect Tissue Res*. 2011;52(4):290-300. doi:10.3109/03008207.2010.523803
115. Asanbaeva A, Masuda K, Thonar EJMA, Klisch SM, Sah RL. Regulation of immature cartilage growth by IGF-I, TGF- $\beta$ 1, BMP-7, and PDGF-AB: role of metabolic balance between fixed charge and collagen network. *Biomech Model Mechanobiol*. 2008;7(4):263-276. doi:10.1007/s10237-007-0096-8
116. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(5):403-412. doi:10.1016/j.joca.2005.10.011
117. Montaseri A, Busch F, Mobasheri A, et al. IGF-1 and PDGF-bb Suppress IL-1 $\beta$ -Induced Cartilage Degradation through Down-Regulation of NF- $\kappa$ B Signaling: Involvement of Src/PI-3K/AKT Pathway. Schneider G, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28663. doi:10.1371/journal.pone.0028663

118. Holland TA, Mikos AG. Advances in drug delivery for articular cartilage. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2003;86(1):1-14. doi:10.1016/s0168-3659(02)00373-5
119. Patil AS, Sable RB, Kothari RM. An update on transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ): sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *J Cell Physiol.* 2011;226(12):3094-3103. doi:10.1002/jcp.22698
120. Woodell-May J, Matuska A, Oyster M, Welch Z, O'Shaughnessey K, Hoepfner J. Autologous protein solution inhibits MMP-13 production by IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ -stimulated human articular chondrocytes: APS INHIBITS MMP-13 IN CHONDROCYTES. *J Orthop Res.* 2011;29(9):1320-1326. doi:10.1002/jor.21384
121. Lasarzik J, Bondzio A, Rettig M, et al. Evaluation of Two Protocols Using Autologous Conditioned Serum for Intra-articular Therapy of Equine Osteoarthritis—A Pilot Study Monitoring Cytokines and Cartilage-Specific Biomarkers. *J Equine Vet Sci.* 2018;60:35-42.e2. doi:10.1016/j.jevs.2016.09.014
122. Huggins C. A general system for the preservation of blood by freezing Long-term Preservation of Red Blood Cells: A Conference Sponsored by the Committee on Blood and Transfusion Problems, Division of Medical Sciences, National Academy of Science-National Research Council, 21 and 22 May 1964. Proceedings by Mary T. Sproul (ed.): National Academies; p. 160; 1965.
123. Wanstrath AW, Hettlich BF, Su L, et al. Evaluation of a Single Intra-Articular Injection of Autologous Protein Solution for Treatment of Osteoarthritis in a Canine Population: Autologous Protein Solution for Treatment of Canine Osteoarthritis. *Vet Surg.* 2016;45(6):764-774. doi:10.1111/vsu.12512
124. Center for disease Control and prevention. Osteoarthritis fact sheet. <https://www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis.htm> Acedido em 14/06/2023.
125. Long H, Liu Q, Yin H, et al. Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis From 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis Rheumatol.* 2022;74(7):1172-1183. doi:10.1002/art.42089
126. Institute for Health Metrics and Evaluation. Global Burden of Disease: Osteoarthritis — Level 3 cause. [https://www.healthdata.org/results/gbd\\_summaries/2019/osteoarthritis-level-3-cause](https://www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019/osteoarthritis-level-3-cause) Acedido a 14/06/2023.

127. Van Drumpt RAM, Van Der Weegen W, King W, Toler K, Macenski MM. Safety and Treatment Effectiveness of a Single Autologous Protein Solution Injection in Patients with Knee Osteoarthritis. *BioResearch Open Access*. 2016;5(1):261-268. doi:10.1089/biores.2016.0014
128. Ramos S, Pinto A, Cardoso M, et al. Prevalence of Radiographic Signs of Osteoarthritis in Lusitano Purebred Horses. *J Equine Vet Sci*. 2020;94:103196. doi:10.1016/j.jevs.2020.103196
129. Sousa NRD, Luna SPL, Pizzigatti D, Martins MTA, Possebon FS, Aguiar ACS. Relation between type and local of orthopedic injuries with physical activity in horses. *Ciênc Rural*. 2017;47(2). doi:10.1590/0103-8478cr20151218
130. Baccarin RYA, Moraes APLD, Veiga ACR, et al. Relação entre exame clínico e radiográfico no diagnóstico da osteoartrite equina. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2012;49(1):73. doi:10.11606/issn.2318-3659.v49i1p73-81
131. Byam-Cook KL, Singer ER. Is there a relationship between clinical presentation, diagnostic and radiographic findings and outcome in horses with osteoarthritis of the small tarsal joints? *Equine Vet J*. 2009;41(2):118-123. doi:10.2746/042516408X345107
132. Denoix JM. Chapter 17 - Ultrasonographic Examination of Joints. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2nd ed. Elsevier Saunders; 2011:206-211.
133. Nelson BB, Kawcak CE, Barrett MF, McIlwraith CW, Grinstaff MW, Goodrich LR. Recent advances in articular cartilage evaluation using computed tomography and magnetic resonance imaging. *Equine Vet J*. 2018;50(5):564-579. doi:10.1111/evj.12808
134. Mayet A, Zablotzki Y, Roth SP, Brehm W, Troillet A. Systematic review and meta-analysis of positive long-term effects after intra-articular administration of orthobiologic therapeutics in horses with naturally occurring osteoarthritis. *Front Vet Sci*. 2023;10:1125695. doi:10.3389/fvets.2023.1125695

# Anexo 1

Tabela 6 - Dados clínicos da amostra populacional em estudo.

Identificação	Idade	Sexo	Raça	Disciplina	Estrutura sinóvia	Membro	Grau de claudicação - AAE	Dor à FP e FA	Efusão clínica	Grau de efusão	Grau radiográfico	Ecografia	Tratamentos anteriores	Resposta à APS	2ª administração APS	Reações adversa	Outcome
1	5	M	PSL	Dressage	MTF	PD	1	Ausente	1	3	2	2	Corticoides	Positiva	Não	0	(+)
2	12	M	PSL	Dressage	IFD	AD	2	Ausente	1	1	2	SD	Corticoides e AH	Positiva	Sim, a longo prazo	0	(+)
3	12	M	PSL	Dressage	Femorotibial	PD	3	Dor à FA	1	2	0	1, 2	Corticoides, AINEs, AH	Positiva	Sim, a longo prazo	0	(+)
4	12	M castrado	Português desporto	Obstáculos	IFP	PD	2	Dor à FP e FA	1	1	2	1, 2	Corticoides e AH	Positiva	Não	0	(+)
5	6	M	PSL	Dressage	IFD	AD	2	Dor à FP e FA	SD	SD	0	SD	Corticoides e AH	Positiva	Não	0	(+)
5					IFD	AE	2	Dor à FP e FA	SD	SD	2	SD	Corticoides e AH	Positiva	Não	0	(+)
6	3	M	PSL	Dressage	MCF	AD	0	Dor à FA	SD	SD	2	SD	Não. Indicação pós-cirurgia	Positiva	Não	0	(+)
7	4	M	PSL	Dressage	MCF	AD	2	Dor à FP e FA	SD	SD	3	SD	Corticoides	Positiva	Sim, a longo prazo	0	(+)
7					MCF	AE	1	Dor à FP e FA	SD	SD	2	SD	Corticoides	Positiva	Sim, a longo prazo	0	(+)
8	3	M	PSL	Dressage	MCF	AD	2	Ausente	SD	SD	2	SD	Não	Positiva	Sim, a longo prazo	0	(+)
8					MCF	AE	2	Dor à FP e FA	SD	SD	3	SD	Não	Positiva	Sim, a longo prazo	0	(+)
9	12	F	Cruzado Português	Lazer	MCF	AD	4	Dor à FP e FA	1	3	SD	SD	Não	Positiva	Não	0	(+)
9					MCF	AE	4	Dor à FP e FA	1	3	2	SD	Não	Positiva	Não	0	(+)
10	14	M castrado	PSL	Dressage	MCF	AE	3	Dor à FP e FA	1	2	3	1,2	Corticoides e AH	Negativa	Sim, a curto prazo	0	(-)
11	1	M	PSL	Dressage	IFD	AD	1	Ausente à FP. FA não testada (poldro)*	1	2	2	1	Repouso	Positiva	Não	0	(+)
11					IFD	AE	1	Ausente à FP. FA não testada (poldro)*	1	2	2	1	Repouso	Positiva	Não	0	(+)
12	7	M	PSL	Dressage	IFD	AD	3	Dor à FA	1	2	3	0	Corticoides e AINE's	Positiva	Não	0	(+)
13	3	M	PSL	Dressage	MTF	PD	2	Dor à FA	1	1	2	SD	Corticoides e AH	Negativa	Não	0	(-)
14	12	M	PSL	Dressage	MCF	AE	2	Dor à FP e FA	1	1	3	SD	Não	Positiva	Não	0	(+)
15	4	M	PSL	Dressage	MCF	AE	1	Dor à FA	0	0	0	SD	Corticoides	Parcialmente positiva	Não	0	(+/-)
16	5	M	PSL	Dressage	MCF	AE	2	Dor à FA	1	1	2	SD	Não	Positiva	Não	0	(+)
17	9	M	PSL	Dressage	MCF	AD	2	Dor à FP e FA	1	1	3	0	Corticoides	Positiva	Não	0	(+)
17					MCF	AE	1	Dor à FP e FA	1	1	2	0	Corticoides	Positiva	Não	0	(+)
18	7	M	PSL	Dressage	IFP	AD	0	Dor à FA	1	1	2	0	2 administrações Estanozolol	Positiva	Não	0	(+)
19	7	F	PSL	Dressage	TT	PE	2	Dor à FA	1	1	0	1	Corticoides, AH	Positiva	Sim, a longo prazo	0	(+)
19					ITD	PE	2	Dor à FA	1	1	2	SD	Corticoides	Positiva	Sim, a longo prazo	0	(+)
19					TMT	PE	2	Dor à FA	1	1	3	SD	Corticoides	Positiva	Sim, a longo prazo	0	(+)
20	7	F	PSL	Dressage	MCF	AD	1	Ausente	1	1	2	0	Não	Positiva	Não	0	(+)
20					MCF	AE	1	Dor à FA	1	1	2	0	Não	Positiva	Não	0	(+)
21	5	F	PSL	Dressage	MCF	AD	1	Dor à FP e FA	1	1	1	SD	Corticoides	Parcialmente positiva	Não. *Lesão posterior concomitante*	0	(+/-)
21					MCF	AE	2	Dor à FP e FA	1	1	1	SD	Corticoides	Parcialmente positiva	Não. *Lesão posterior concomitante*	0	(+/-)

## Legenda:

M - Macho  
 F - Fêmea  
 AE - Anterior Esquerdo  
 AD - Anterior Direito  
 PE - Posterior Esquerdo  
 PD - Posterior Direito  
 AH - Ácido Hialurónico  
 AINEs - Anti-Inflamatórios Não Esteroides  
 FP - Flexão Passiva  
 FA - Flexão Ativa  
 SD - Sem dados

## Ecografia:

0 - Sem alterações significativas; sem sinovite/capsulite  
 1 - Sinovite  
 2 - Capsulite

## Efusão clínica:

0 - Ausente  
 1 - Presente

## Grau de efusão:

0 - Ausente  
 1 - Ligeira  
 2 - Moderada  
 3 - Severa

## Reações adversas:

0 - Ausente  
 1 - Presente

Tabela 7 - Discriminação dos tratamentos por articulação e por membro.

	MCF	IFP	IFD	MTF	FT	TT	ITD	TMT	Total
AD	7	1	3						11
AE	10		3						13
PD		1		2	1				4
PE						1	1	1	3
<b>Total</b>	17	2	6	2	1	1	1	1	

## Anexo 2

Tabela 8 – Testes estatísticos (Correlação de Spearman e Teste do qui-quadrado) para análise da relação entre as variáveis: "grau radiográfico" e "grau de claudicação".

Grau radiográfico	Grau de claudicação (AAEP) antes da infiltração										Total	
	0		1		2		3		4		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Sem alterações	0 <sub>a</sub>	0,0	1 <sub>a</sub>	11,1	2 <sub>a</sub>	13,3	1 <sub>a</sub>	33,3	0 <sub>a</sub>	0,0	4	13,3
Variações de anatomia Normal	0 <sub>a</sub>	0,0	1 <sub>a</sub>	11,1	1 <sub>a</sub>	6,7	0 <sub>a</sub>	0,0	0 <sub>a</sub>	0,0	2	6,7
Alterações Ligeiras	2 <sub>a</sub>	100,0	7 <sub>a</sub>	77,8	7 <sub>a,b</sub>	46,7	0 <sub>b</sub>	0,0	1 <sub>a</sub>	100,0	17	56,7
Alterações Moderadas	0 <sub>a,b</sub>	0,0	0 <sub>b</sub>	0,0	5 <sub>a,b</sub>	33,3	2 <sub>a</sub>	66,7	0 <sub>a,b</sub>	0,0	7	23,3
Alterações Severas	0 <sub>a</sub>	0,0	0 <sub>a</sub>	0,0	0 <sub>a</sub>	0,0	0 <sub>a</sub>	0,0	0 <sub>a</sub>	0,0	0 <sub>a</sub>	0,0
<b>Total</b>	2	6,7	9	30,0	15	50,0	3	10,0	1	3,3	30	100,0
Associação e relação	$X^2_{(12)}=11,524; p=0,242$					$r_s=0,226; p=0,229$						

\*Letras iguais não evidenciam diferenças significativas\*.

Tabela 9 – Teste estatístico de Mann-Whitney para análise da relação entre as variáveis: "grau radiográfico" e presença/ausência de "dor à FP e à FA" e "necessidade de 2ª administração de APS".

Variável	Categoria	N	Grau radiográfico			U	
			Min.-Máx.	Mediana	MR	Mann-Whitney	p
Dor FP	Ausente	17	0-3	2	14,21	88,500	0,281
	Presente	13	0-3	2	17,19		
Dor FA	Ausente	4	2-2	2	14,00	46,000	0,920
	Presente	24	0-3	2	14,58		
Necessidade de 2ª de APS	Não	20	0-3	2	14,60	82,000	0,440
	Sim	10	0-3	2	17,30		

0- Sem alterações. 2- Alterações ligeiras. 3- Alterações moderadas. MR- Rank Médio. p- p-valor bilateral.

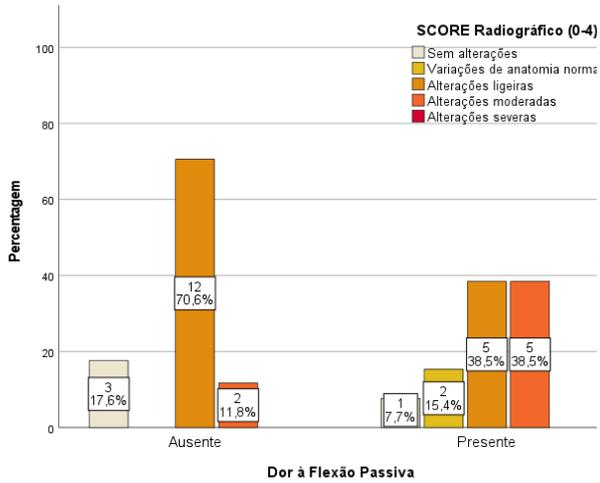


Gráfico 13 - Distribuição do "grau (score) radiográfico" por "dor à flexão passiva".

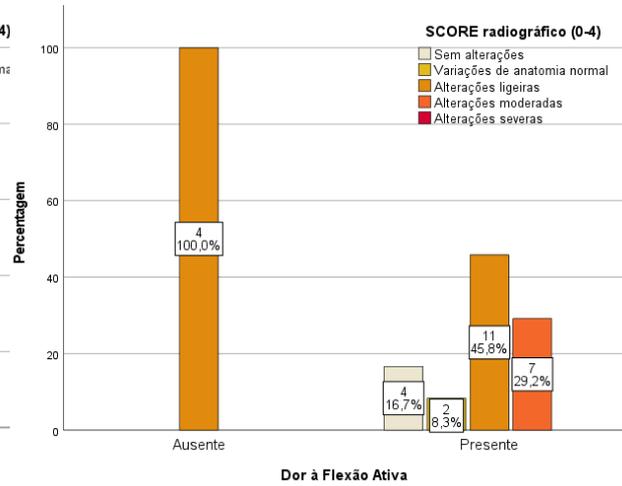


Gráfico 14 - Distribuição do "grau (score) radiográfico" por "dor à flexão ativa".

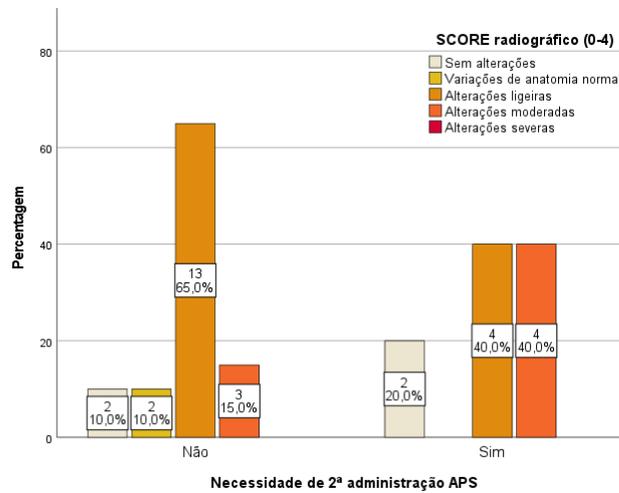


Gráfico 15 - Distribuição do "grau (score) radiográfico" por "necessidade de 2ª administração de APS".

Tabela 10 – Teste estatístico de Mann-Whitney para análise da relação entre as variáveis: "grau de claudicação" e "necessidade de 2ª administração de APS".

Necessidade de administração de APS	2ª	Grau de claudicação (AAEP)			U		
		N	Min.-Máx.	Mediana	MR	Mann-Whitney	p
Não		21	0-4	2	14,29	69,000	0,050
Sim		10	1-3	2	19,60		

MR- Rank Médio. \*Diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .\*

Tabela 11 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis para análise da relação entre as variáveis: "grau de claudicação" e "resposta à APS".

Resposta à APS	N	Grau de claudicação (AAEP)			H	
		Min.-Máx.	Mediana	MR	Kruskal-Wallis	p
Negativa	2	2-3	2	23,50	2,632	0,247
Parcialmente positiva	3	1-2	1	11,00		
Positiva	26	0-4	2	16,00		

MR- Rank Médio. \*Diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .\*

Tabela 12 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis para análise da relação entre as variáveis: "grau radiográfico" e "resposta à APS".

Resposta à APS	N	Grau radiográfico			H	
		Min.-Máx.	Mediana	MR	Kruskal-Wallis	p
Negativa	2	2-3	2	21,00	7,111	0,019
Parcialmente positiva	3	0-1	1	4,50 <sup>1</sup>		
Positiva	25	0-3	2	16,38 <sup>1</sup>		

MR- Rank Médio. \*Diferenças significativas para  $p \leq 0,05$  (\*)

Tabela 13 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis para análise da relação entre as variáveis: "grau de efusão clínica" e "resposta à APS".

Resposta à APS	N	Grau de efusão clínica			H	
		Min.-Máx.	Mediana	MR	Kruskal-Wallis	p
Negativa	2	1-2	1	14,00	3,518	0,183
Parcialmente positiva	3	0-1	1	6,33		
Positiva	19	1-3	1	13,32		

MR- Rank Médio. \*Diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .\*

Tabela 14 - Teste estatístico do Qui-quadrado para análise da relação entre a "resposta à APS" e a presença de "dor à flexão passiva", "dor à flexão ativa" e "efusão clínica".

Variável	Resposta à APS	N	Ausente		Presente		X <sup>2</sup>	p
			n	%	n	%		
<b>Dor FP</b>	Negativa	2	1	50,0	1	50,0	0,665	0,781
	Parcialmente positiva	3	1	33,3	2	66,7		
	Positiva	26	15	57,7	11	42,3		
<b>Dor FA</b>	Negativa	2	0	0,0	2	100,0	0,967	1,000
	Parcialmente positiva	3	0	0,0	3	100,0		
	Positiva	24	4	16,7	20	83,3		
<b>Efusão clínica</b>	Negativa	2	0	0,0	2	100,0	7,304	0,208
	Parcialmente positiva	3	1	33,3	2	66,7		
	Positiva	19	0	0,0	19	100,0		

\*Diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .\*