



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO PRELIMINAR DE COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DA PROTEÍNA C-REACTIVA NO
SORO E NO LÍQUIDO SINOVIAL DE CANÍDEOS COM DOENÇA DEGENERATIVA
ARTICULAR

Simão Batista Boal

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira
Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz
Doutor Luis Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO PRELIMINAR DE COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DA PROTEÍNA C-REACTIVA NO
SORO E NO LÍQUIDO SINOVIAL DE CANÍDEOS COM DOENÇA DEGENERATIVA
ARTICULAR

Simão Batista Boal

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira
Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz
Doutor Luis Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

2013

LISBOA

Agradecimentos

Aos meus pais por sempre terem acreditado e nunca desistirem.

Ao Professor Miguel Carreira, por ter aceitado orientar-me, por toda a dedicação e tempo despendido, mas acima de tudo pela amizade.

À empresa Tridelta Development Ltd, pela disponibilização dos testes de ELISA necessários para a realização deste estudo.

A todos os funcionários do Hospital da FMV, Auxiliares, Enfermeiro e Médicos, em especial à Dr. Inês Marques por toda a simpatia e pela contribuição para o crescimento do meu interesse pela Medicina Interna. Ao Dr. Rodolfo Leal, por toda a ajuda indispensável na realização das análises deste estudo. A todos os meus colegas estagiário em particular ao Francisco Silveira pela amizade e camaradagem.

Aos meus amigos que me acompanharam neste percurso. Em especial à Sandra, à Sara, ao Catela, ao Zé Nuno, ao Zé Flávio, à Rita, à Carolina e ao Daniel.

À Ti Lena por me ter aturado este tempo todo.

Estudo Preliminar de Comparação dos Níveis da Proteína C-Reactiva no Soro e no Líquido Sinovial de Canídeos com Doença Degenerativa Articular

Resumo

A doença degenerativa articular (DDA) apresenta uma etiologia múltipla que envolve factores bioquímicos, biomecânicos e genéticos de todas as estruturas da articulação sinovial, e caracteriza-se por uma perda generalizada e progressiva da cartilagem articular, acompanhada pela tentativa de reparação da mesma. Muito embora esteja classificada como uma doença articular não inflamatória, sabe-se que existe um importante componente inflamatório regional constituído por um caldo heterogéneo de citocinas pró-inflamatórias que surgem em quantidades significativas, que estimulam a síntese da proteína C-reactiva (PCR). O presente estudo desenvolvido numa amostra de 16 (n=16) canídeos (*Canis familiaris*) com diagnóstico de DDA e um grupo controlo, teve como objectivos: 1) detectar e quantificar a PCR no líquido sinovial da articulação afectada, utilizando para tal um teste ELISA validado para a detecção e quantificação da PCR sérica (PhaseTM Range Canine C-Reactive Protein Assay, comercializado pelo laboratório Tridelta Development Limited), 2) estudar as possíveis relações entre os valores da PCR sérica e sinovial, 3) entender de que modo os parâmetros: dor, condição corporal, tipo de actividade física, contagem de leucócitos, sexo, grau de DDA apresentada pelos indivíduos com DDA podem influenciar os níveis da PCR sérica e sinovial. Os resultados permitiram concluir que o teste de ELISA é válido para determinar e quantificar a PCR no líquido sinovial; que existe uma relação entre a PCR sérica e a PCR sinovial ($R=0,78$ com $p<0,001$); que indivíduos com DDA apresentam níveis séricos da PCR dentro dos valores de referência, e que se verifica uma relação entre o nível algico do doente e a concentração da PCR sérica ($p=0,01$).

Palavras-chave: Proteína C-reactiva; Doença degenerativa articular; Líquido sinovial; Soro; Articulação; Canídeo.

Preliminary Study of Comparison of C-Reactive Protein Levels in Serum and Synovial Fluid of Canine with Degenerative Joint Disease

Abstract

The degenerative joint disease presents a diverse etiology involving biochemical, biochemical and genetic factors of all synovial structures, being characterized by a widespread and a progressive loss of articular cartilage, followed by repair attempted of it. Although classified as a non-inflammatory joint disease, is known that there is a significant inflammatory component, comprising a local heterogeneous broth of pro-inflammatory cytokines that occur in significant quantities, which stimulate the synthesis of C-reactive protein (CRP). The study was conducted on a 16 sample (n = 16) of *Canis familiaris* diagnosed with DDA and a control group, with the following aims: 1) identify and quantify the CRP in the synovial fluid of the affected joint using a validated ELISA test for detection and quantification of seric PCR (Phase™ Range Canine C-Reactive Protein Assay, Tridelata Development Limited), 2) study the possible association between serum and synovial PCR levels 3) determine the influence of pain, body condition, physical activity, WBC, sex, and DDA grade presented by patients in serum and synovial PCR levels.

The results showed that the ELISA test is effective to determine and quantify the synovial PCR; that there is a relationship between serum and synovial PCR ($R = 0.78$ with $p < 0.001$); that individuals with DDA have higher serum PCR within the reference values, and that there is a relationship between the patient's pain level and serum PCR concentration ($p = 0.01$).

Keywords: C-reactive protein, Degenerative joint disease, Synovial fluid, Serum, Joint, Dogs

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice	vii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	ix
Lista de Gráficos.....	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Lista de Símbolos	xii
I-Relatório de Actividades de Estágio	1
II Revisão Bibliográfica.....	4
1. As Articulações	4
1.1. Articulações Fibrosas ou Sinartroses	4
1.1.1. Sindesmose.....	4
1.1.2. Sutura	4
1.1.3. Gonfose	5
1.2. Articulações Cartilagíneas ou Anfiartroses	5
1.2.1. Sincondrose	5
1.2.2. Sínfise.....	5
1.3. Articulações Sinoviais ou Diartroses	6
2. Constituintes da Articulação Sinovial	6
2.1. A Cartilagem articular	6
2.1.1. Estrutura e Organização Funcional da Cartilagem Articular	7
2.1.1.1. Os Condrócitos	9
2.1.1.2. Matriz extracelular.....	9
2.1.1.2.1. Colagénio	10
2.1.1.2.2. Proteoglicanos e Glucosaminoglicanos	11
2.1.1.2.3. Outros constituintes da matriz	13
2.1.1.3. Regiões da matriz extracelular	13
2.1.2. Interacção condrócitos-matriz extracelular	14
2.1.3. Regulação do metabolismo da cartilagem articular	14
2.1.4. As propriedades biomecânicas da cartilagem articular	15
2.2. A cápsula articular	16
2.3. O líquido sinovial.....	17
2.4. Os ligamentos	17
2.5. Os discos e meniscos articulares.....	17
3. As Alterações de cartilagem articulares	18
3.1. As Doenças Articulares Não Inflamatórias.....	18
3.1.1. A Doença Degenerativa Articular (DDA).....	18
3.1.1.1. As Protéases da Matriz Extracelular	23
3.1.1.1.2. As Citoquinas Pró-inflamatórias.....	25
3.1.1.1.3. As Citoquinas Anti-inflamatórias	26
3.1.1.1.4. Outros participantes na degradação da cartilagem	26
3.1.2. Neoplasia articular.....	26
3.2. Doenças Articulares Inflamatórias.....	27
3.2.1 Doenças Articulares Infecciosas (Artites).....	27
3.2.1.1. Artrite séptica (Bacteriana).....	27
3.2.1.3. Artrite por Hemoprotozoários	29
3.2.1.4. Artrite por <i>Mycoplasma</i>	30
3.2.1.5. Artrite por Fungos	30

3.2.1.6. Artrite por Protozoários	30
3.2.1.7. Artrite Viral.....	30
3.2.2. Doenças Articulares Não Infecciosas (Artrites Imunomediadas).....	30
3.2.2.1. Doenças Articulares Erosivas	31
3.2.2.1.1. Artrite Reumatóide	32
3.2.2.1.2. Poliartrite progressiva crónica felina.....	33
3.2.2.1.3. Poliartrite erosiva dos galgos	33
3.2.2.2. Doenças Articulares Não Erosivas.....	33
3.2.2.2.1. Lupus Eritematoso Sistémico (LES)	33
3.2.2.2.2. Sinovite linfocítica plasmocítica	34
3.2.2.2.3. Síndrome de poliartrite /polimiosite canina	34
3.2.2.2.4. Síndrome poliartrite/meningite.....	35
3.2.2.2.5. Poliartrite nodosa.....	35
3.2.2.2.6. Síndrome de poliartrite juvenil no Akita	35
3.2.2.2.7. Artrite inflamatória do Shar-Pey	35
3.2.2.2.8. Artrite induzida por fármacos.....	35
3.2.2.2.9. Reacções vacinais.....	36
3.2.2.2.10. Poliartrite idiopática	36
4. Diagnóstico da DDA	37
4.1. História e sinais clínicos.....	37
4.2 Técnicas de diagnóstico adicionais	37
4.2.1. Radiografia	37
4.2.2. Tomografia Axial Computorizada.....	38
4.2.3. Ressonância Magnética	38
4.2.4. Ultra-sonografia.....	38
4.2.5. Artroscopia	39
4.2.6. Artrocentese	39
5. O Fenómeno de Resposta da Fase Aguda	39
5.1. A Proteína C-Reactiva (PCR).....	40
5.1.1. Estrutura Molecular da PCR.....	41
5.1.2. Biossíntese da PCR.....	42
5.2. As Funções Biológicas da PCR.....	43
5.3. Factores que influenciam os valores da PCR no soro	44
5.4. Quantificação das concentrações da PCR	45
5.5. Factores pré-analíticos que influenciam os resultados	46
III. Trabalho experimental	47
1. Objectivos	47
2. Material e métodos.....	47
2.1. Amostra	47
3. Resultados	48
3.1. Caracterização da amostra.....	48
3.2. Concentração da PCR no soro e líquido sinovial	49
3.3. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial nos indivíduos com DDA e o género/sexo	50
3.4. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial dos indivíduos com DDA e a presença de dor.....	51
3.5. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial dos indivíduos com DDA e os sinais radiográfica da DDA na articulação afectada	52
3.6. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial dos indivíduos com DDA e a condição corporal e a actividade física.	53
3.7. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial dos indivíduos com DDA com a articulação afectada.....	54

3.8. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial de indivíduos com DDA e o início dos sinais clínicos	55
3.9. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial de indivíduos com DDA e a contagem de leucócitos	55
4. Discussão.....	57
IV. Bibliografia.....	63
V. Anexos	70
Anexo 1- Estatística descritiva da casuística avaliada durante o estágio curricular realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, no período relativo a Setembro de 2012 até Fevereiro de 2013.....	70
Anexo 2 - Caracterização da população estudo e controlo.....	74
Anexo 3 - Ficha de caracterização dos doentes.	76
Anexo 4 - Classificação radiográfica dos doentes com DDA.....	77
Anexo 5 - Protocolo utilizado para determinar a concentração da proteína C reactiva sérica através do método ELISA.....	78
Anexo 6 - Estatística descritiva da componente experimental.	83
Anexo 7 - Caracterização da condição corporal.	84

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resultado da concentração da PCR do grupo em estudo.....	49
Tabela 2 - Resultados da concentração da PCR do grupo controlo.	50
Tabela 3- Concentração da PCR em função do género, nos indivíduos com DDA.	51
Tabela 4 - Concentração da PCR em função da presença de dor, nos indivíduos com DDA.	52
Tabela 5- Concentração da PCR em função da classificação radiográfica, nos indivíduos com DDA.	53
Tabela 6- Concentração da PCR em função da condição corporal, nos indivíduos com DDA.	53
Tabela 7 - Concentração da PCR em função da actividade física, nos indivíduos com DDA.	54
Tabela 8 - Concentração da PCR em função da articulação afecta.....	54
Tabela 9 - Concentração da PCR em função do início dos sinais clínicos.....	55
Tabela 10 - Contagem de leucócitos dos indivíduos com DDA.	56
Tabela 11 - Contagem de leucócitos dos indivíduos da amostra controlo.	56
Tabela 12 - Caracterização do grupo em estudo.	74
Tabela 13 - Caracterização do grupo controlo.	75
Tabela 14 - Gradação da DDA (adaptada da classificação Brunnberg, 1987).....	77
Tabela 15 - Valores da idade (anos) dos dois grupos.....	83
Tabela 16 - Valores do peso (kg) dos dois grupos.	83
Tabela 17 - Concentrações da PCR (mg/l) nos dois grupos.....	83
Tabela 18 - Tabela de caracterização da condição corporal (adaptado de Laflamme, 1997).....	84

Lista de Figuras

Figura 1- Articulação do joelho, exemplo de uma articulação sinovial	6
Figura 2 - Organização estrutural da cartilagem articular em 4 zonas	7
Figura 3 - Representação da matriz extracelular da cartilagem articular e seus constituintes .	10
Figura 4 - Esquema representativo da fisiopatologia da degradação da cartilagem articular, conducente ao aparecimento da doença degenerativa articular.....	21
Figura 5- Diagrama do complexo PCR-fosfocolina	41

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Variação da concentração da PCR no líquido sinovial em função da concentração da PCR nos indivíduos com DDA.....	50
Gráfico 2 - Variação da concentração da PCR no soro dos indivíduos com DDA em função da presença de dor.	52

Gráfico 3 - Frequência relativa (%) das diferentes espécies animais na área da Medicina Interna.	70
Gráfico 4 - Frequência relativa (%) dos casos clínicos acompanhados nas áreas de Medicina	70
Gráfico 5 - Frequências relativas (%) dos casos acompanhados nas diferentes áreas da Patologia Médica.....	71
Gráfico 6 - Frequência relativa (%) das espécies animais acompanhadas nas consultas de Ortopedia e Traumatologia.	71
Gráfico 7 - Frequências relativas (%) dos casos acompanhados nas Consultas de Ortopedia e Traumatologia.	72
Gráfico 8 - Frequências relativas (%) referentes à casuística acompanhada em Cirurgia.	72
Gráfico 9 - Frequências relativas (%) referentes à casuística acompanhada em Cirúrgica, por espécie.....	73

Lista de Imagens

Imagem 1 - Imagens de Rx digital de joelhos na projecção latero-lateral	38
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADAMTS	<i>Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i> ; desintegrina metaloproteínases com domínios de tromboplastina
AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
ALT	Alanina aminotransferase
ANA	<i>Anti-nuclear antibodies</i> ; anticorpo antinucleares
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
AST	Aspartato aminotransferase
C1	Proteína 1 do sistema de complemento
C1q	Fracção q da proteína 1 do sistema de complemento
C3	Proteína 3 do sistema de complemento
C3a	Fracção a da proteína 3 do sistema de complemento
C3b	Fracção b da proteína 3 do sistema de complemento
C4	Proteína 4 do sistema de complemento
C5	Proteína 5 do sistema de complemento
C9	Proteína 9 do sistema de complemento
C/EBP	<i>Enhancer-binding proteins</i>
C/EBP β	<i>Enhancer-binding proteins beta</i>
C/EBP δ	<i>Enhancer-binding proteins delta</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DDA	Doença degenerativa articular

DLA-DRB1	<i>Dog leukocyte antigen-DRB1 gene</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAS	Fosfatase alcalina sérica
FcγRI	<i>Fc-gamma receptor 1</i>
FcγRII	<i>Fc-gamma receptor 2</i>
FeLV	<i>Feline leukemia vírus; vírus da leucemia felina</i>
FeSFV	<i>Feline syncytia-forming vírus; vírus formador de sincício felino</i>
G	Constante de gravitação universal
GAGs	Glucosaminoglicanos
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LES	Lupos eritematoso sistémico
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-21	Interleucina 21
ITMP	Inibidores tissulares de metaloproteínases
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1; factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1</i>
Leu	Leucina
MHC	<i>Major histocompatibility complex; complexo de maior histocompatibilidade</i>
MMPs	<i>Matrix metaloproteínases; metaloproteínases de matriz</i>
MMP-1	<i>Matrix metalloproteinase-1; Metaloproteínase de matriz-1</i>
MMP-2	<i>Matrix metalloproteinase-2; Metaloproteínase de matriz-2</i>
MMP-3	<i>Matrix metalloproteinase-3; Metaloproteínase de matriz-3</i>
MMP-8	<i>Matrix metalloproteinase-8; Metaloproteínase de matriz-8</i>

MMP-9	<i>Matrix metalloproteinase-9</i> ; Metaloproteínase de matriz-9
MMP-13	<i>Matrix metalloproteinase-13</i> ; Metaloproteínase de matriz-13
m-ARN	Ácido ribonucleico mensageiro
MT-MMPs	Metaloproteínases do tipo membranas
NO	Monóxido de azoto
O ₂	Oxigénio
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PCR	Proteína C-reactiva
PgE	Prostaglandina E
Phe	Fenilalanina
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RPLA	<i>Reverse passive latex agglutination</i> ; aglutinação passiva reversa em látex
Rx	Raio X
spp.	<i>Species pluralis</i> ; espécies
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAC	Tomografia axial computadorizada
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i> ; factor de transformação do crescimento beta
Thr	Treonina
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> ; factor de necrose tumoral alfa
TTA	<i>Tibial tuberosity advancement</i> ; avanço da tuberosidade tibial

Lista de Símbolos

<	Menor
=	Igual
±	Desvio padrão
%	Porcentagem
°C	Grau Celcius
H	Horas
kDa	Quilo Dalton
Kg	Quilograma
N	Amostra
Nm	Nanómetros
mg/l	Miligramas por litro
mm ³	Milímetro cúbico

R	Correlação
$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitro
μl	Microlitro
μm	Micrómetro

I-Relatório de Actividades de Estágio

O estágio curricular foi realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, sobre a orientação do Professor Miguel Carreira no período decorrido entre Setembro de 2012 a Fevereiro de 2013. Durante este período foi-me possível aplicar na prática os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, assim como a aquisição de novos conhecimentos nas diferentes actividades clínicas das áreas de Medicina Interna, Imagiologia, Internamento e Cirurgia. O estágio compreendeu turnos rotativos de 8 horas com horários das 9h-17h e das 13h-21h, à excepção do internamento em que os turnos eram de 24 horas. No total foram realizadas 1224 horas de estágio. A análise descritiva relativa à casuística acompanhada encontra-se referida em anexo (Anexo 1).

Medicina Interna

Na Medicina Interna foi possível acompanhar os Médicos Veterinários de serviço, num total de 504 horas. Esta área além da vasta casuística observada permitiu um grande contacto com os proprietários dos doentes, condição essencial para melhorar e desenvolver técnicas de comunicação e interpretação da informação colhida. Na grande maioria das consultas foi-me permitido a realização da história pregressa e o exame físico dos doentes, sendo posteriormente a consulta prosseguida pelo Médico Veterinário assistente. No âmbito das consultas foi possível realizar actos como: vacinações, administração de fármacos, cateterizações periféricas, colheitas biológicas (sangue), algaliações, punções aspirativas por agulha fina (PAAF) e preparação de soros. A maioria dos animais observados foram canídeos (75%), seguido dos felídeos (22%) e por último os exóticos (logomorfos, aves, roedores e quelónios - 3%). As consultas nesta área puderam ser divididas em duas grandes áreas, a Patologia Médica e a Medicina Preventiva (da qual fazem parte a vacinação, desparasitação e identificação electrónica). Na Patologia Médica foi possível assistir a consultas de diferentes especialidades como a ortopedia/traumatologia, oftalmologia, oncologia, endocrinologia, comportamento animal, neurologia e dermatologia. No decorrer do estágio assisti também a casos de urgência, sendo os casos mais comuns os doentes traumatizados, em choque, convulsivos, com torções gástricas, com golpes de calor e dispneicos. Nestes quadros, prestei auxílio ao Médico assistente no estabelecimento de uma via aberta periférica venosa e respiratória, administração de fármacos e fluidos e ainda no desenvolvimento da técnica de reanimação.

Consultas de Ortopedia/Traumatologia

Nesta consulta de especialidade, os doentes eram na sua maioria referenciados. Destes, 86% eram canídeos e os restantes felídeos. Nas consultas desta especialidade foi possível aprimorar a técnica de realização do exame objectivo ortopédico, assim como a avaliação de exames radiográficos associados a cada doente.

Internamento

Foram realizadas 312 horas de internamento ao longo dos 6 meses de estágio. Nesta área foi possível um acompanhamento mais aprofundado de cada caso, através do comprimento do plano diário elaborado pelo Médico Veterinário responsável, que incluiu a monitorização dos doentes, preparação e administração de terapêuticas, alimentação, passeios, recolhas de amostras biológicas (sangue e urina), registos clínicos e higienização. A monitorização era efectuada 3 vezes por dia com o registo da frequência cardíaca e respiratória, avaliação da coloração das mucosas, do pulso e tempo de repleção capilar. Por vezes foi necessário uma monitorização mais intensa de alguns doentes, nos casos de condições críticas. O conforto e o bem-estar dos animais foram sempre tidos em conta, na realização de todos os procedimentos. Durante todo o período de internamento existiu uma relação de bastante proximidade com os Enfermeiros, Auxiliares Veterinários e com o Médico responsável pelo internamento, com o qual foi sempre possível o esclarecimento de qualquer dúvida e ao qual eram comunicadas todas as alterações encontradas. Devido ao grande volume de trabalho desempenhado foi possível desenvolver capacidades de gestão e planificação para poder realizar várias tarefas de uma forma mais eficiente.

Imagiologia

Nesta área realizei 72 horas, divididas pelas áreas de radiologia, ecografia e tomografia computadorizada. Na radiologia, foi possível assistir à realização de estudos radiográficos simples ou contrastados, nomeadamente trânsitos baritados e mielografias. Pude auxiliar na contenção e posicionamento dos doentes e por vezes foi possível proceder ao disparo do aparelho de Rx, bem como à revelação da cassete. Na ecografia, assisti principalmente à realização de ecografias abdominais, mas também algumas ecocardiografias. Nesta área procedi principalmente à contenção do doente. Em alguns casos foi-me possível realizar a tricotomia e iniciar o exame ecográfico. Tive ainda a possibilidade de realizar cistocentese e abdominocentese. Na tomografia axial, procedi principalmente à contenção, cateterização dos doentes, indução e controlo da anestesia.

Cirurgia

Foram realizadas nesta área 336 horas. Desta área fazia parte a recepção e pesagem dos doentes que iam entrar em bloco. Na sala de preparação foi possível proceder à sua cateterização, estabelecimento da fluidoterapia, bem como preparação e administração de terapêutica pré-anestésica, indução anestésica e intubação do doente. Nesta área desempenhei 3 funções distintas: anestesista, circulante e ajudante de cirurgião. Na posição de circulante era responsável pela preparação da área cirúrgica, com tricotomia, lavagem e desinfecção da mesma e ainda no auxílio na preparação do Cirurgião e ajudante de cirurgião, dentro do bloco tinha como função facultar todo o material cirúrgico necessário. Das funções de anestesista fazia parte a monitorização do doente desde que entrava na sala de preparação até ao seu recobro no internamento, bem como o controlo da anestesia durante a cirurgia. Na função de ajudante de cirurgião foi possível participar directamente na cirurgia auxiliando o Cirurgião nos acessos cirúrgicos, limpeza do campo, suturas e outros procedimentos necessários. Foi ainda possível realizar cirurgias electivas em gatos como orquiectomias e ovariectomias sobre supervisão do Cirurgião. No bloco cirúrgico, foram sempre cumpridas todas as condições de assepsia exigidas. No final de cada cirurgia realizou-se a ficha pós-operatória de cada doente, com os cuidados pós-operatórios e o plano terapêutico. Em alguns casos foi possível fazer o acompanhamento pós-cirúrgico de alguns destes doentes, onde foi avaliada a sua recuperação e realizada a remoção dos pontos de sutura. Os casos observados na área da Cirurgia podem ser divididos em 5 grupos: 1) Cirurgia geral, o grupo mais representativo de toda a casuística observada onde predominou a ovariectomia e a mastectomia, mas onde também foi possível observar a realização de laparotomia exploratória, enterectomia, esplenectomia, nefrectomia, gastropexia, exérese de nódulos cutâneos, hemitireoidectomia, cesariana, exodontias e destarizações, 2) Neurocirurgia, onde foi possível observar a realização de hemilaminectomias, 3) Ortopedia/Traumatologia, em que foi possível observar várias técnicas de osteossíntese, com recurso a agulhas de Kirschner, placa, parafusos, cerclages e fixadores externos, ainda à realização de amputação de membros, artroplastias com ressecção da cabeça do fémur, desmoplastia do ligamento cruzado anterior através da técnica TTA e da técnica intra-capsular *Over the Top* e correcção de luxações mediais de patela recorrendo a trocleoplastia, transposição da tuberosidade tíbia e sutura de imbrincamento, 4) Oftalmologia, no qual observei a realização de blefaroplastia e cirurgia de cataratas através da técnica de facoemulsificação, e 5) Pequena cirurgia, da qual fizeram parte a remoção de pequenos nódulos cutâneo, a remoção de agulhas de Kirschner e pequenas suturas de pele.

II Revisão Bibliográfica

1. As Articulações

Uma articulação é uma estrutura anatómica formada pela união de duas ou mais peças constituintes do sistema esquelético (osso ou cartilagem), envolvidas por tecido conjuntivo fibroso, cartilagem ou por uma combinação de ambos. A sua função é conferir estabilidade às zonas de reunião entre os vários segmentos do esqueleto, permitindo um determinado grau de mobilidade entre eles, proporcionando estabilidade ao corpo necessária para o suporte de peso e para a locomoção. Embora com algumas variações consideráveis entre si, as articulações possuem certos aspectos morfo-funcionais em comum que as permitem classificar em três grandes grupos: articulações fibrosas ou sinartroses, articulações cartilagíneas ou anfiartroses e as articulações sinoviais ou diartroses (Getty, 1986).

1.1. Articulações Fibrosas ou Sinartroses

Caracterizadas pela união dos segmentos articulares ser realizada por tecido fibroso de tal modo desenvolvido que impede praticamente a existência de movimento e por não apresentarem cavidade articular, sendo por isso designadas também de articulações fixas ou imóveis. A maioria destas articulações é apenas temporária, pois o meio de união é invadido pelo processo de ossificação primária o que resulta numa sinostose (sutura dos ossos). Consideram-se 3 classes: sindesmose, sutura e gonfose (Getty, 1986).

1.1.1. Sindesmose

A união é formada por tecido fibroso, tecido elástico ou por uma mistura dos dois. São articulações pouco frequentes, da qual são exemplo a articulação temporo-hioide, a articulação dos corpos dos metacarpianos no cavalo e a inserção das cartilagens costais entre si (Getty, 1986).

1.1.2. Sutura

Este termo aplica-se às articulações do crânio, no qual os ossos adjacentes estão intimamente unidos por várias camadas de tecido fibroso que limitam intensamente os movimentos, embora confirmam alguma elasticidade ao crânio, a qual tende a desaparecer com a ossificação do tecido interposto resultante do avançar da idade. A forma de como as margens ósseas entram em contacto é variável, havendo por isso vários tipos de suturas. Na sua maioria estas margens caracterizam-se por apresentarem irregularidades que se engrenam formando a sutura serrata, como é o caso da sutura interfrontal. Em outros casos a união das margens é feita em bisel, como é o caso da sutura escamosa que articula as porções escamosas dos ossos

temporal e parietal. Por último, existe a sutura plana em que as margens dos ossos são planas ou levemente enrugadas, sendo a sutura internasal o exemplo mais característico (Getty, 1986).

1.1.3. Gonfose

Não existe praticamente movimento nenhum, devido ao elevado nível de tecido conjuntivo fibroso. O exemplo deste tipo de articulação é a que existe entre os dentes e os alvéolos dentários, cuja principal função é a de fixar os dentes no seu receptáculo, aqui conseguida graças ao tecido fibroso do ligamento periodontal (Getty, 1986).

1.2. Articulações Cartilagíneas ou Anfiartroses

Neste tipo de articulações os ossos estão unidos por fibrocartilagem, por cartilagem hialina, ou por uma combinação de ambas. O número e o tipo de movimentos são relativamente reduzidos e estão condicionados pela forma das estruturas articulares, assim como pela quantidade e flexibilidade do meio de união. Podem ser classificadas em 2 grupos: sincondrose e sínfise (Getty, 1986).

1.2.1. Sincondrose

Nesta articulação o material de união dos elementos estruturantes é a cartilagem hialina. Muitas sincondroses são articulações temporárias, uma vez que a cartilagem acaba por ser substituída por osso com o tempo. É exemplo as placas epifisárias que unem a epífise e a diáfise dos ossos longos nos indivíduos jovens e que depois desaparecem com a fusão óssea após o crescimento. Estão ainda incluídos neste grupo as articulações da porção basilar do occipital com o corpo do esfenóide, a articulação entre a parte petrosa e estiloideia do osso temporal, a junção costochondral e a sincondrose intermandibular (Getty, 1986).

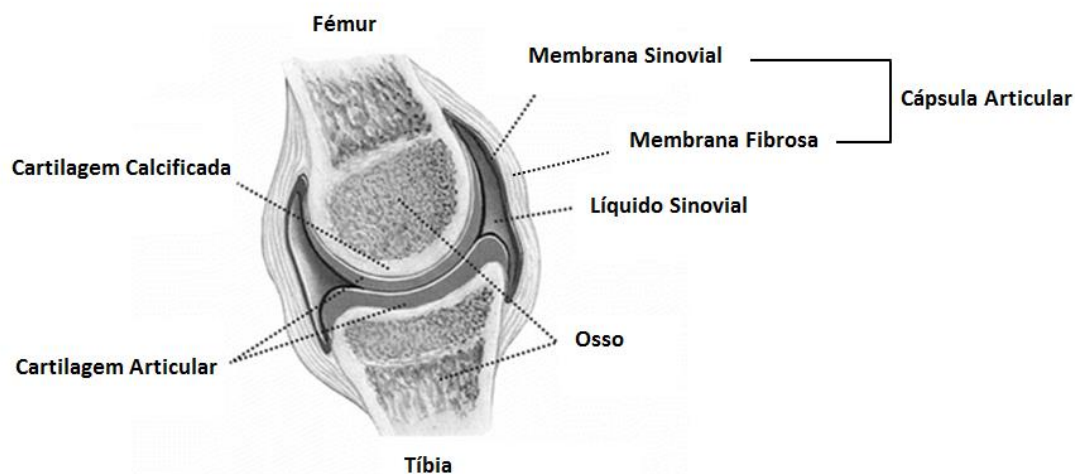
1.2.2. Sínfise

Estas articulações, também designada de fibrocartilaginosas, apresentam a unir as estruturas constituintes faixas de fibrocartilagem. Um exemplo de uma sínfise é a articulação entre os corpos das vertebrae feito através de uma fibrocartilagem especial, o disco intervertebral. Outros exemplos são a sínfise pélvica, as esternóbras e a sínfise mandibular. Algumas destas articulações tendem a desaparecer com o crescimento devido à fusão óssea, como é o caso da sínfise mandibular (Getty, 1986).

1.3. Articulações Sinoviais ou Diartroses

Estas articulações (Figura 1) são as mais complexas e permitem ao contrário dos outros grupos uma grande variedade de movimentos, motivo pelo qual são também conhecidas como articulações verdadeiras ou móveis. Na realidade esta mobilidade franca resulta da não existência entre as superfícies ósseas de um meio de ligação (fibroso ou cartilagíneo) que impeça o deslizamento de uma superfície óssea sobre a outra. Neste caso, embora os topos dos ossos constituintes da articulação se encontrem em contacto, eles não estão directamente unidos pois estão revestidos por uma cartilagem que permite a realização de movimentos quase livres de atrito, o qual é ainda diminuído pela presença de um líquido articular o líquido sinovial, que para além de outras funções importantes tem a acção de lubrificante. Todas as articulações deste grupo estão envolvidas por uma cápsula articular, a qual confere estabilidade à articulação, retendo no seu interior o líquido sinovial no espaço que se denomina cavidade articular. Algumas articulações podem apresentar ainda ligamentos intra-articulares, meniscos e almofadas de gordura (Getty, 1986).

Figura 1 - Articulação do joelho, exemplo de uma articulação sinovial (Adaptado de Schulz & Bader, 2007).



2. Constituintes da Articulação Sinovial

2.1. A Cartilagem articular

A superfície do osso articular apresenta-se revestida por uma camada de 1 a 5 mm de espessura de cartilagem hialina, a qual actua como uma superfície de deslize, facilitando assim os movimentos articulares. A espessura da cartilagem articular varia dentro da mesma articulação, entre articulações e entre indivíduos e está relacionada com vários aspectos entre os quais a pressão que tem de suportar e ainda com a morfologia das superfícies articulares

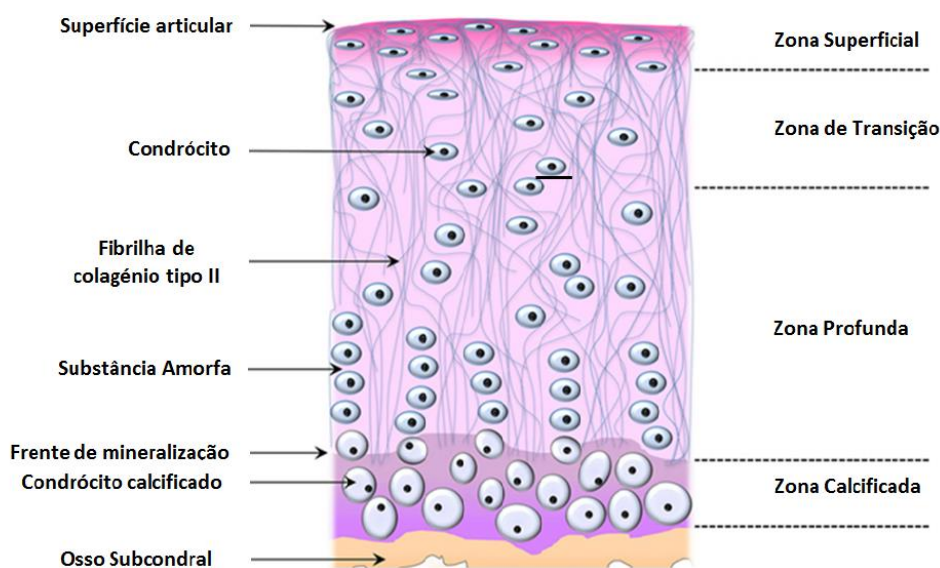
(Espanha, 2010). Caracterizada por apresentar uma elevada flexibilidade e resistência às compressões, a cartilagem apresenta uma elevada capacidade para distribuir as cargas mecânicas pela sua superfície, funcionando assim como um amortecedor, de modo a prevenir e/ou minimizar as lesões no osso subcondral subjacente (Schulz, 2007). Macroscopicamente a cartilagem hialina é normalmente branca/azulada, lisa, brilhante e translúcida, não apresentando vascularização sanguínea, linfática nem terminações nervosas (Jaffee, 1972), sendo nutrida pelos capilares do tecido conjuntivo envolvente, o pericôndrio. Como a cartilagem articular não possui pericôndrio, a nutrição é feita por difusão a partir do líquido sinovial (Junqueira & Carneiro, 2004; Piermattei, Flo & DeCamp, 2006).

2.1.1. Estrutura e Organização Funcional da Cartilagem Articular

A cartilagem articular é constituída por um único tipo de células os condrócitos, que se localizam dentro de pequenos compartimentos denominados de lacunas, relativamente dispersos numa abundante e complexa matriz extracelular, onde também se localizam várias macromoléculas (Eurell & Van Sickle, 1998).

Nos adultos a cartilagem apresenta a sua estrutura organizada em 4 camadas ou zonas diferentes, caracterizadas com base na sua morfologia celular e na orientação espacial das fibras, sendo elas as seguintes: zona superficial, zona de transição, zona profunda e zona calcificada (Figura 2) (Bélanger, 1977; Buckwalter, Mankin & Grodzinsky, 2005; Junqueira & Carneiro, 2004; Pearle, Warren & Rodeo, 2005).

Figura 2 - Organização estrutural da cartilagem articular em 4 zonas (Adaptado de Matta & Zakany, 2013).



A ZONA SUPERFICIAL constitui a superfície articular e corresponde a uma camada fina onde predominam os condrócitos finos e achatados, dispersos entre uma baixa concentração de proteoglicanos e alta de fibras de colagénio. As fibras de colagénio desta zona encontram-se densamente organizadas e a sua orientação é paralela à superfície articular, conferindo a esta região uma maior rigidez e resistência relativamente às outras zonas (Buckwalter et al., 2005). Abaixo da zona superficial localiza-se a ZONA DE TRANSIÇÃO, é uma zona mais ampla que a anterior sendo formada por condrócitos de maiores dimensões dispersos de uma forma uniforme pela matriz e possuindo proteoglicanos em maiores quantidade. Aqui as fibras de colagénio estão dispostas de uma forma aleatória formando uma malha entrelaçada e irregular. Segue-se a ZONA PROFUNDA, caracterizada por apresentar proteoglicanos em elevadas concentrações, fibras de colagénio dispostas perpendicularmente à superfície articular e condrócitos grandes e com uma forma esférica. Esta é a camada que apresenta maior capacidade compressiva (Pearle et al., 2005). Dentro de cada lacuna podem estar 1, 2, 4 ou 6 condrócitos, formando colunas regulares de células paralelas às fibras de colagénio. Sempre que uma lacuna apresenta mais do que 1 condrócito é designada de grupo isogénico (Eurell & Van Sickle, 1998). Os condrócitos dentro do grupo isogénico representam células que se dividiram recentemente e à medida que os condrócitos deste grupo produzem mais matriz vão-se afastando uns dos outros formando lacunas separadas, contribuindo assim para o crescimento da cartilagem, que ao processar-se deste modo é chamado de crescimento intersticial (Ross & Pawlina, 2006). Na fronteira da cartilagem com o osso subjacente, os condrócitos contêm apenas pequenas quantidades de retículo endoplasmático e de complexo de Golgi, sugerindo assim um baixo nível de actividade metabólica. Em algumas regiões, esta matriz está completamente calcificada e os condrócitos encontram-se encarcerados (Buckwalter et al., 2005). Existe uma calcificação e fusão gradual da matriz com o osso, formando a ZONA CALCIFICADA (Schulz, 2007), a qual bloqueia a passagem de solutos a partir do osso subcondral, tornando a nutrição da cartilagem articular dependente da difusão de nutrientes e troca de metabolitos do líquido sinovial, com a superfície articular (Maroudas, Bullough, Swanson & Freeman, 1968).

Entre a zona calcificada e a não calcificada é possível de observar, através do recurso à coloração de hematoxilina e eosina, uma linha basófila que representa a frente de mineralização (*Tidemark*) (Junqueira & Carneiro, 2004). No Homem, em indivíduos com idades superiores a 60 anos e em animais idosos (Eurell & Van Sickle, 1998) essa frente de mineralização apresenta mais do que uma linha basófila indicando que a mineralização da

cartilagem foi interrompida e retomada por várias vezes. Tal também ocorre em indivíduos com osteoartrite articular, que apresentam múltiplas linhas basófilas (Bullough, 2007).

2.1.1.1. Os Condrócitos

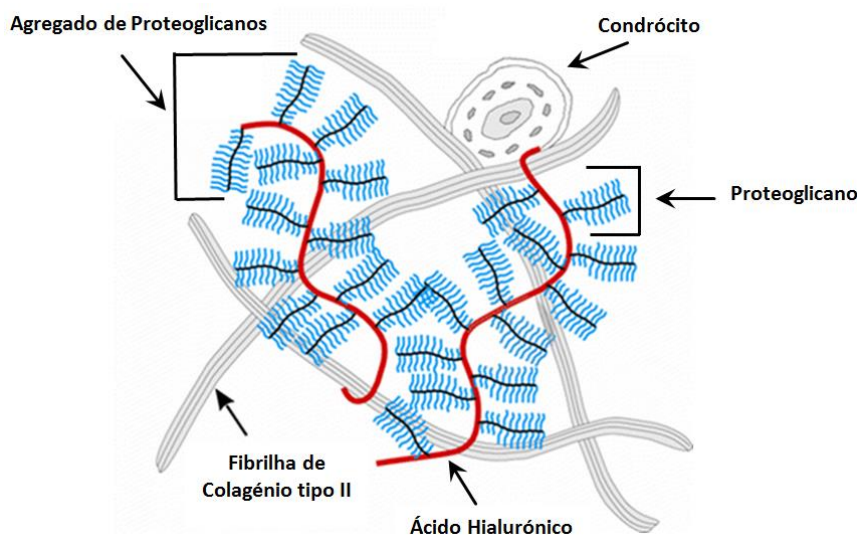
Os condrócitos são células de origem mesenquimatosa (Goldberg & Rabinovitch, 1977), altamente especializadas, metabolicamente activas, e responsáveis pela produção, organização e manutenção da matriz extracelular. São ainda responsáveis pela produção de colagénio, proteoglicanos e glicoproteínas (Junqueira & Carneiro, 2004). Uma vez que a cartilagem articular não é vascularizada obtêm a sua nutrição a partir do líquido sinovial, através de meios de difusão (Junqueira & Carneiro, 2004; Piermattei et al., 2006). Como já referido anteriormente os condrócitos das diferentes zonas da cartilagem diferem no tamanho, forma e actividade metabólica, apresentando contudo, todas as organelas citoplasmáticas, cujas que mais se evidenciam são o retículo endoplasmático rugoso (RER), (responsável pela síntese proteica dos constituintes da matriz) e o complexo de Golgi (que também participa na produção das macromoléculas da matriz) (Buckwalter et al., 2005; Espanha, 2010). A quantidade de RER é normalmente considerada como um indicativo da actividade de síntese proteica da célula. Os condrócitos que se encontram na zona de transição estão activos na produção constante de componentes da matriz. Na cartilagem imatura, a mitose ocorre principalmente nos condrócitos da zona de transição, o que faz com que na fase de crescimento ocorra um grande crescimento cartilagíneo. Os condrócitos jovens apresentam no citoplasma um grande número de mitocôndrias, um RER elaborado, bem como um complexo de Golgi bem desenvolvido. À medida que os condrócitos vão envelhecendo a sua capacidade mitótica vai diminuindo, há uma diminuição gradual de organelas celulares com uma abundância de ribossomas livres no citoplasma (Gartner & Hiatt, 2001). Isto é bastante evidente em determinadas circunstâncias, como lesões na cartilagem e doença degenerativa articular em que os condrócitos não conseguem reiniciar a síntese celular essencial para a recuperação da cartilagem (Piermattei et al., 2006).

2.1.1.2. Matriz extracelular

Os condrócitos da cartilagem hialina estão envolvidos por uma substância fundamental, denominada de **MATRIZ EXTRACELULAR** (Figura 3), que é composta por glucosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos e glicoproteínas multiadesivas (proteínas não colagénicas), onde também se encontram fibras como o colagénio (Eurell & Van Sickle, 1998). Trata-se de uma rede sólida e firme, que apresenta contudo alguma maleabilidade em

virtude da elevada quantidade de água que a compõe (cerca de 80% do peso da cartilagem) (Mankin, 1974), conferindo-lhe características únicas.

Figura 3 - Representação da matriz extracelular da cartilagem articular e seus constituintes (Adaptado de Schulz & Bader, 2007).



2.1.1.2.1. Colagénio

As fibras de colagénio formam uma intrincada rede conferindo uma estrutura à matriz. Trata-se do principal componente extracelular do tecido conjuntivo (Ross & Pawlina, 2006), responsável pela resistência da matriz às forças de tensão que se exercem paralelamente à superfície da cartilagem articular. As suas fibras são formadas por finas fibrilhas agregadas paralelamente com 10 a 300nm de diâmetro. Por sua vez as próprias fibrilhas são formadas por de um conjunto altamente regular de subunidades mais pequenas chamadas de tropocolagénio, com cerca de 280nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro, onde é possível identificar uma cabeça e uma cauda (Gartner & Hiatt, 2001), alinhando-se cabeça de uma molécula com cauda da molécula seguinte dentro da mesma linha, apresentando sempre um espaço de intervalo regular entre elas e estando cerca de 25% do seu comprimento adiantadas relativamente às moléculas das linhas paralelas adjacentes. Esta estrutura é constituída por ligações covalentes, sendo a responsável pela força apresentada pelas fibrilhas (Pearle et al., 2005; Ross & Pawlina, 2006). Cada molécula de colagénio é constituída por 3 cadeias α polipeptídicas, enroladas numa configuração de tripla hélice (Gartner & Hiatt, 2001). Cada cadeia α é formada por cerca de 1000 aminoácidos, sendo 1/3 deles representado pela glicina, muito importantes devido ao seu pequeno tamanho que permite uma estreita relação entre as 3 cadeias α . Outros 2 aminoácidos também bastante abundantes são a prolina e a lisina que se

encontram na forma hidroxilada. (Gartner & Hiatt, 2001). As ligações por ponte de hidrogénio da hidroxiprolina mantêm juntas as 3 cadeias, enquanto que a hidroxilisina permite a formação das fibrilhas através da ligação das moléculas de colagénio entre si (Gartner & Hiatt, 2001). As moléculas de colagénio são classificadas de acordo com o tipo de combinação das cadeias α que a constituem. O colagénio tipo I representa cerca de 90% de toda a proteína de colagénio presente no organismo (Eurell & Van Sickle, 1998), sendo que o tipo II é o predominante na matriz da cartilagem hialina, seguindo os tipos VI, IX, X e XI (em menor quantidade) (Eyre, Wu & Woods, 1992). O colagénio tipo II é assim responsável por conferir à cartilagem resistência às forças compressivas que se exercem e tem como particularidade o facto de formar uma grande quantidade de fibrilhas finas (Ross, & Pawlina, 2006), que embora não sendo muito compridas vão aumentando a sua espessura à medida que se afastam das lacunas (Gartner & Hiatt, 2001), organizadas na matriz extracelular sob influência do colagénio tipo X (Ross & Pawlina, 2006). Os colagénios tipo IX e XI, caracterizam-se por se associarem em fibrilhas com interrupção na estrutura helicoidal, não formando fibras por si próprias mas associando-se a outros colagénios fibrilares (Espanha, 2010). O Colagénio tipo IX contribui essencialmente para a estabilização da rede de colagénio tipo II da matriz extracelular, através da ligação das fibrilhas deste colagénio com os proteoglicanos da matriz extracelular nos seus pontos de intersecção. Quanto ao colagénio tipo XI, este regula o tamanho das fibrilhas do colagénio tipo II. O colagénio tipo VI diferencia-se dos restantes por ser uma proteína não fibrilar composto por três cadeias α distintas (Espanha, 2010) e que se encontra principalmente na periferia dos condrócitos, contribuindo para a sua fixação no interior da estrutura da matriz extracelular (Ross & Pawlina, 2006).

2.1.1.2.2. Proteoglicanos e Glucosaminoglicanos

Além das fibrilhas de colagénio na matriz extracelular existem também glucosaminoglicanos (GAGs), dos quais os mais importantes são o sulfato de condroitina 4, sulfato de condroitina 6, sulfato de queratano e ainda o ácido hialurónico (Ross & Pawlina, 2006). Estes GAGs são polissacarídeos de cadeia longa não ramificada, compostos por repetições de unidades de dissacarídeos, sendo que um destes dissacarídeos é sempre formado por um açúcar aminado de origem alimentar (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina) e o outro por um ácido urónico (ácido glucurónico ou ácido idurónico). À excepção do ácido hialurónico, todos os GAGs são sulfurados. O ácido hialurónico consiste numa molécula longa e rígida de grandes dimensões com cerca de 25 000 repetições de dissacarídeos unidos por ligações do tipo β -1,4 e não apresenta nenhum grupo sulfato (Ross & Pawlina, 2006). No sulfato de condroitina as

ligações dos dissacarídeos também são do tipo β -1,4, e no sulfato de queratano são do tipo β -1,3 (Gartner & Hiatt, 2001).

Os glucosaminoglicanos apresentam uma elevada carga negativa (devido à presença dos grupos éster-sulfato e grupo carboxilo) a qual impõe a estes constituintes uma forma linear e inflexível, impedindo-os de se enrolarem e de originarem estruturas globosas compactas. Além disso exercem uma grande atracção por catiões, em particular sódio, os quais por sua vez criam uma elevada força osmótica, atraindo assim água para o interior da matriz extracelular. Os sulfatos de condroitina e de queratano ligam-se de forma covalente a proteínas, as quais funcionam como um núcleo proteico formando um monómero de proteoglicano (Goldberg & Rabinovitch, 1977) que apresenta tamanhos variáveis dependendo da dimensão do núcleo proteico. Na cartilagem hialina, o monómero de maiores dimensões é o Agrecano, constituído aproximadamente por 100 cadeias de sulfato de condroitina e até 60 de sulfato de queratano (Ross & Pawlina, 2006). As moléculas de Agrecano ligam-se não covalentemente a uma molécula de ácido hialurónico (o qual funciona como núcleo) por interacção entre o açúcar aminado deste e a proteína núcleo do Agrecano. Esta ligação é reforçada ainda por proteínas de ligação, originando agregados de proteoglicanos (Goldberg & Rabinovitch, 1977), relativamente grandes, já que a cada molécula de ácido hialurónico estão ligados mais de 300 agrecanos (Ross & Pawlina, 2006). Por sua vez, agregados de proteoglicanos ligam-se às fibrilhas de colagénio através de interacções electrostáticas e por meio de acção de glicoproteínas multiadesivas (Ross & Pawlina, 2006). Esta intrincada relação que se estabelece entre os agregados de proteoglicanos e as fibras de colagénio é responsável pelas características bioquímicas únicas da cartilagem hialina (Eyre, Wu & Woods, 1992). A decorina, o biglicano e a fibromodulina são proteoglicanos de outras dimensões que também existem na matriz extracelular (Buckwalter et al., 2005; Espanha, 2010; Ross & Pawlina, 2006), caracterizados por serem de pequenas dimensões e por não formarem agregados, ligando-se a outras macromoléculas influenciando a função celular (Ross & Pawlina, 2006). A decorina e a fibromodulina encontram-se ligadas a locais específicos ao longo das fibrilhas de colagénio tipo II, parecendo desempenhar um papel na organização e na estabilização da rede deste colagénio. A decorina parece estar ainda relacionada com o factor de transformação do crescimento β (TGF- β), modulando a actividade deste e desempenhando deste modo um papel na proliferação celular (Buckwalter et al., 2005; Espanha, 2010). Quanto ao biglicano, ele encontra-se mais concentrado na matriz ao nível pericelular e interage com o colagénio tipo VI, participando na formação da rede estrutural. (Buckwalter et al., 2005; Espanha, 2010).

2.1.1.2.3. Outros constituintes da matriz

Tal como já referido na matriz extracelular existem ainda glicoproteínas multiadesivas às quais são atribuídas funções como: 1) facilitar a interação dos condrócitos com as moléculas da matriz, 2) manutenção das propriedades mecânicas do tecido, 3) sequestro de factores de crescimento e de proteases para compartimentos específicos da matriz e 4) como marcadores clínicos da transformação e degradação da cartilagem (Espanha, 2010; Ross & Pawlina, 2006). Um exemplo destas proteínas é a Ancorina CII que funciona como um receptor da molécula de colagénio no condrócito. A Tenascina e a Fibronectina são também proteínas importantes na ancoragem dos condrócitos na matriz extracelular (Ross & Pawlina, 2006). A chamada proteína oligomérica da matriz extracelular da cartilagem, desempenha um papel muito importante na homeostasia da matriz através da capacidade de se ligar aos condrócitos e estimulá-los a produzir mais fibrilhas de colagénio tipo II, pelo que é considerada um biomarcador da renovação da cartilagem (Buckwalter et al., 2005), assim a níveis séricos elevados associa-se potencialmente à presença de alterações na cartilagem, no ósseo e/ou inflamação sinovial. (Espanha, 2010). Na matriz extracelular também existem gases diluídos, uma elevada concentração de catiões e metabolitos (Buckwalter et al., 2005).

2.1.1.3. Regiões da matriz extracelular

A matriz extracelular está subdividida em 3 regiões: 1) **MATRIZ PERICELULAR**, que forma um anel em redor dos condrócitos com aproximadamente 1 a 3µm de espessura (Gartner & Hiatt, 2001), apresenta as concentrações mais elevadas de glucosaminoglicanos, fibronectina e decorina. É aqui que se localizam quase todas as fibras de colagénio tipo VI (os quais formam um involucro em redor dos condrócitos) e tipo IX (Ross & Pawlina, 2006); 2) **MATRIZ TERRITORIAL**, que envolve a matriz pericelular de cada condrócito (podendo em alguns locais envolver os pares ou conjuntos destes condrócitos) (Buckwalter et al., 2005), consiste numa faixa de 50µm de espessura onde existe uma rede de colagénio tipo II aleatoriamente dispersa, conjuntamente com pequenas quantidades de colagénio tipo IX, sulfato de condroitina e sulfato de queratano (ambos em concentrações inferiores à região anterior) (Gartner & Hiatt, 2001); 3) **MATRIZ INTERTERRITORIAL**, a qual constitui a grande maioria da matriz extracelular e corresponde a todo o espaço localizado entre os vários grupos de condrócitos, sendo rica em colagénio tipo II, mas pobre em proteoglicanos comparativamente à região anterior (Ross & Pawlina, 2006).

2.1.2. Interação condrócitos-matriz extracelular

A interação que existe entre os condrócitos e a matriz extracelular é de particular importância, já que é ela que assegura a manutenção da cartilagem articular ao longo da vida (Buckwalter et al., 2005). Esta relação não termina no momento em que os condrócitos produzem as macromoléculas constituintes da matriz extracelular, a qual ao proteger os condrócitos de lesões mecânicas decorrentes do funcionamento normal da articulação contribui assim para a sua integridade (Schulz, 2007). Nutrientes, produtos metabólicos (anabólicos/catabólicos) e outro tipo de moléculas que ajudam na regulação dos condrócitos como as citocinas e os factores de crescimento passam obrigatoriamente pela matriz, podendo mesmo em algumas circunstâncias ser armazenados nesta (Buckwalter et al., 2005). A cartilagem articular encontra-se em constante renovação (Junqueira & Carneiro, 2004), pois embora os condrócitos adultos não apresentem uma grande capacidade proliferativa (Onyekwelu, Goldring & Hidaka, 2009; Piermattei et al., 2006) eles são bastante activos do ponto de vista metabólico, estabelecendo um equilíbrio entre a síntese de novos elementos da matriz e a degradação dos velhos e alterados (Buckwalter et al., 2005). O envelhecimento dos condrócitos altera profundamente a capacidade funcional associada à diminuição da sua capacidade de síntese de alguns proteoglicanos, a sua capacidade proliferativa e a capacidade de resposta a estímulos anabólicos. Alterações desta natureza são particularmente importantes, já que limitam a capacidade dos condrócitos em manter e restaurar a matriz extracelular contribuindo ainda para o desenvolvimento e progressão da degenerescência da cartilagem articular (Buckwalter et al., 2005).

2.1.3. Regulação do metabolismo da cartilagem articular

Um grande número de factores influencia o metabolismo da cartilagem articular, sendo associados a 2 grupos: 1) os que resultam na síntese de nova cartilagem (anabólicos); e 2) os que aumentam a destruição da cartilagem (catabólicos) (Buckwalter et al., 2005; Sandell & Aigner, 2001). É sabido que a actividade anabólica surge como resposta às necessidades estruturais da matriz extracelular ou outros estímulos, como o factor de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1) e o factor de transformação do crescimento β (TGF- β) que estimulam a síntese de matriz extracelular e a proliferação celular. Contrariamente os processos de degradação parecem ser o resultado final de uma complexa cascata de fenómenos que inclui a intervenção da interleucina-1 (IL-1), da interleucina-6 (IL-6) e do factor de necrose tumoral α (TNF- α), os quais estimulam a produção de metaloproteínases e inibem a síntese de novos proteoglicanos. Para contrariar a acção das metaloproteínases os condrócitos produzem os inibidores tissulares das metaloproteínases (ITMP), cuja função é

anular a acção destas e controlar assim a degradação da cartilagem (Buckwalter et al., 2005; Sandell & Aigner, 2001).

A mobilidade da articulação também é um factor importante para o metabolismo da cartilagem articular. Pamoski, Perricone e Brandt (1979) demonstraram que a imobilização da articulação do joelho resulta quase sempre na diminuição da produção de glucosaminoglicanos, e que o inverso, ou seja o exercício parece aumentar a síntese dos constituintes da matriz extracelular. Em geral, parece que existe uma janela de *stress* fisiológico, acima ou abaixo do qual os condrócitos não conseguem manter o adequado funcionamento da matriz (Bullough, 2007).

Com o envelhecimento dos condrócitos a síntese das macromoléculas que constituem a matriz extracelular sofre algumas alterações. O tamanho dos proteoglicanos, que conferem à cartilagem as suas características de resistência diminui com o avançar da idade e conseqüentemente os agreganos tornam-se mais pequenos. Do mesmo modo, as ligações covalentes entre fibrilhas de colagénio aumentam com o envelhecimento, o que torna a matriz menos deformável. Também foi demonstrado que o envelhecimento diminui a responsividade dos condrócitos aos factores de crescimento, como IGF-1, o que se reflecte na redução da sua actividade anabólica (van der Krann & van den Berg, 2008).

2.1.4. As propriedades biomecânicas da cartilagem articular

As propriedades biomecânicas da cartilagem articular são determinadas pelas características da sua matriz extracelular, ou seja pela capacidade constitutiva e organizativa dos seus constituintes (GAGs, proteoglicanos e colagénio) que ao estabelecerem intrincadas relações lhe conferem a capacidade de resistir a compressões fisiológicas, forças de tração e forças de cisalhamento (Eyre, Wu & Woods, 1992). Devido ao poder aniónico dos proteoglicanos, em particular ao sulfato de condroitina e em menor grau ao sulfato de queratano, os proteoglicanos conseguem criar uma elevada pressão osmótica na matriz extracelular contribuindo para uma grande retenção de água no seu seio (Eurell & Van Sickle, 1998), a qual é controlada pelas fibrilhas de colagénio tipo II, que impedem que exista uma expansão excessiva da cartilagem, já que numa solução livre o espaço ocupado pelos proteoglicanos é cinco vezes superior ao que ocupam na matriz extracelular da cartilagem hialina (Olsson & Ekman, 2002). Devido a esta particularidade sempre que são aplicadas forças de compressão à cartilagem, verifica-se um deslocamento da água aprisionada pelos GAGs para locais da matriz extracelular onde as forças de compressão são menores, assim como para o líquido sinovial. Quando a compressão cessa e a pressão osmótica exercida pelos GAGs excede essa força de compressão, a água volta novamente a ligar-se a eles (Schulz, 2007). É esta capacidade

que a matriz extracelular tem que a torna resistente e capaz de absorver choques, minimizando assim as lesões dirigidas ao osso subcondral subjacente. Ao mesmo tempo esta movimentação da água que ocorre na matriz extracelular nas diferentes regiões da cartilagem de modo a suportar as forças compressivas, proporciona ainda uma boa lubrificação de toda a superfície articular, facilitando o movimento articular, assim como circulação de nutrientes e de produtos catabólicos resultantes da actividade dos condrócitos e que é muito importante uma vez que a cartilagem é avascular e alinfática (Eurell & Van Sickle, 1998; Pearle et al., 2005; Piermattei et al., 2006). Contudo existe um limite para o nível de compressão que a matriz extracelular consegue suportar já que os glucosaminoglicanos apresentam elevadas cargas negativas que se repelem mutuamente condicionando desta forma a própria compressão existente (Piermattei et al., 2006).

2.2. A cápsula articular

A cápsula articular envolve a superfície externa da articulação e é formada por duas camadas, uma mais externa de tecido conjuntivo fibroso e uma mais interna denominada de camada ou membrana sinovial. A camada fibrosa também denominada de ligamento capsular, tem como principal função conferir estabilidade à articulação, assumindo uma grande variabilidade na sua espessura o que faz com que em alguns locais seja bastante espessa e em outros esteja praticamente ausente, sendo nestas casos a cápsula articular constituída apenas por membrana sinovial. (Getty, 1986). A membrana sinovial reveste todas as estruturas no interior da cavidade articular, à excepção das cartilagens articulares e dos meniscos, podendo em alguns casos revestir tendões e ligamentos (Piermattei et al., 2006). Consiste numa fina membrana, cuja superfície está coberta por *villi* altamente suprida por uma intrincada rede de vasos sanguíneos, linfáticos e também por nervos. É constituída por 2 tipos de células (Barland, Novikoff & Hamerman, 1962): 1) os sinoviócitos tipo A, que são menos comuns e que apresentam funções semelhantes aos macrófagos, ou seja desempenham funções fagocíticas e sintetizam IL-1 e prostaglandina E (PgE) (Schulz, 2007); e 2) os sinoviócitos tipo B, que são os mais abundantes e são responsáveis pela produção do ácido hialurónico presente no líquido sinovial (Barland et al., 1962). Considerando isto a membrana sinovial desempenha estas 3 funções principais: 1) produção de ácido hialurónico presente no líquido sinovial; 2) fagocitose dos resíduos provenientes do metabolismo dos elementos constituintes da articulação; e ainda 3) regulação da movimentação dos solutos, electrólitos e proteínas dos capilares para o líquido sinovial, os quais são necessários para o metabolismo dos condrócitos e também para a regulação da manutenção da matriz extracelular através da acção de vários mediadores inflamatórios e de crescimento (Bullough, 2007).

2.3. O líquido sinovial

O líquido sinovial apresenta-se macroscopicamente como um líquido viscoso, de cor amarelada, correspondendo a um dialisado do plasma sanguíneo sintetizado a partir do grande suprimento vascular da membrana sinovial. É filtrado pelo endotélio vascular e depois pelo interstício sinovial, consistindo numa solução complexa de glucosaminoglicanos, principalmente por ácido hialurónico, proteínas, leucócitos, electrólitos, e nutrientes. A sua principal função é lubrificar a articulação diminuindo o atrito e assim o desgaste da cartilagem. Tem também um papel importante na nutrição da cartilagem articular, funcionando como meio de transporte fornecendo nutrientes e oxigénio (O₂) e removendo dióxido de carbono (CO₂) e detritos do metabolismo (Piermattei et al., 2006). O transporte dos nutrientes depende da difusão, o que significa que será tanto mais rápido quanto maior a agitação a que o líquido estiver sujeito. Se a articulação for utilizada normalmente, o próprio movimento faz com que exista agitação natural do líquido sinovial pelo que a difusão ocorrerá normalmente, contudo quando a articulação está imobilizada durante longos períodos, a difusão dos nutrientes pelo fluido é afectada o que terá consequências na viabilidade da cartilagem articular (Bullough, 2007; Schulz, 2007).

2.4. Os ligamentos

Os ligamentos articulares são fortes faixas ou membranas, geralmente constituídas por tecido conjuntivo fibroso que unem os ossos entre si, estabilizando assim a articulação. Podem ser divididos em 2 grupos de acordo com a sua posição na articulação: 1) extra-articulares, que estão frequentemente fundidos com a cápsula fibrosa, muito embora em outras situações estejam perfeitamente distintos, como são os casos dos ligamentos colaterais lateral e medial da articulação do joelho que se encontram laterais à articulação e os 2) intra-articulares, que mais correctamente devem ser referidos como intra-capsulares pois embora dentro da capsula fibrosa eles não estão em contacto com a cavidade articular, uma vez que se encontram envolvidos pela membrana sinovial (Getty, 1986).

2.5. Os discos e meniscos articulares

Estes elementos são placas de fibrocartilagem ou tecido fibroso denso, constituídos principalmente por colagénio justaposto entre superfícies articulares, dividindo total ou parcialmente a cavidade articular em 2 compartimentos e tornam certas superfícies articulares mais congruentes, proporcionando uma maior amplitude e variedade de movimentos, absorvendo também algumas forças diminuindo assim o impacto recebido pela articulação (Getty, 1986).

3. As Alterações de cartilagem articulares

Nas articulações sinoviais a cartilagem tem por função: 1) manter a estabilidade durante o movimento, 2) dar liberdade às superfícies articulares opostas para se moverem de forma não dolorosa 3) promover a distribuição equitativa das cargas pelos tecidos articulares. Assim o aparecimento de alterações em qualquer um dos seus constituintes, terá consequências ao nível da estrutura e/ou composição da matriz extracelular com conseqüente alteração das funções normais da articulação, traduzindo-se em instabilidade articular, perda de movimento, má distribuição de forças e dor (Bullough, 2007). No cão a patologia articular é dividida em 2 grandes grupos: 1) não inflamatória e 2) inflamatória (Schulz, 2007).

3.1. As Doenças Articulares Não Inflamatórias.

O termo artrose designa a lesão articular não inflamatória de carácter crónico, caracterizada por falta de uma resposta inflamatória na membrana sinovial e pela presença de líquido sinovial normal ou próximo do normal (Piermattei et al., 2006), podendo ser dividida em: 1) doença degenerativa articular (DDA), 2) traumática e 3) neoplásica (Pedersen, 1978).

3.1.1. A Doença Degenerativa Articular (DDA)

A doença degenerativa articular (DDA) também designada de osteoartrite ou osteoartrose. (existindo alguma discussão sobre qual dos termos será o mais correcto (Denny & Butterworth, 2000; Piermattei et al., 2006)) consiste numa perda generalizada e progressiva de cartilagem articular, acompanhada pela tentativa de reparação da mesma, com remodelação e esclerose do osso subcondral, e em muitos casos com formação de quistos subcondrais e de osteófitos marginais (Bennett, 2010a; Buckwalter et al., 2005; Espanha, 2010). Trata-se de uma patologia que não afecta apenas a cartilagem articular, mas que envolve todas as estruturas da articulação sinovial, incluindo o osso subcondral, a membrana sinovial, os ligamentos (quando presentes), a cápsula articular e até mesmo os músculos peri-articulares (Bennett, 2010a; Buckwalter et al., 2005; Espanha, 2010). Embora classificada como não inflamatória sabe-se que existe um importante componente inflamatório regional, contudo muito menor quando comparado com a exuberância apresentada nas doenças articulares inflamatórias (Kapoor, Martel-Pelletier, Lajeunesse, Pelletier & Fahmi, 2011; Piermattei et al., 2006). Mesmo que os sinais clássicos de inflamação possam não estar presentes, grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias são detectadas (Goldring, 2000). Actualmente a DDA não é considerada como uma doença simples, mas sim como uma etapa final na lesão articular, com múltiplas etiologias que envolvem factores biomecânicos, bioquímicos e genéticos (Bennett, 2010a; Goldring, 2000; Kapoor et al., 2011). Assim sendo a DDA pode

surgir devido a forças aplicadas sobre a cartilagem ou em consequência de outras lesões articulares, como infecções, doenças imunomediadas, osteocondrose, displasia de anca e/ou cotovelo, luxação de patela ou lesões ao nível dos ligamentos cruzados, sendo que nestes casos a DDA se designa-se de secundária. A DDA primária descreve pois todas as situações em que se acredita que exista um defeito fundamental nas propriedades dos biomateriais constituintes da cartilagem articular, mas que não tem uma causa conhecida (Denny & Butterworth, 2000; Piermattei et al., 2006)

A DDA secundária é o tipo mais observado no cão e no gato (Bennett, 2010a; Piermattei et al., 2006). Vários factores influenciam a gravidade e a velocidade de progressão da DDA, entre eles estão a quantidade de exercício que o animal pratica e o seu peso corporal (Bennett, 2010a). A maioria dos animais que apresentam artrose têm um peso acima do normal, o qual provoca um *stress* acrescido sobre a articulação contribuindo para a sua abrasão e degenerescência da cartilagem de um modo mais rápido (Piermattei et al., 2006). A idade também é um dos factores importantes. À excepção dos indivíduos com doença de Legg-Calvé-Perthes, osteocondrose e osteopatia metafisária (Piermattei et al., 2006) raramente a DDA é observada em jovens, já que é com o avançar da idade que ocorrem alterações na matriz extracelular da cartilagem, traduzindo-se na perda da capacidade dos condrócitos de manter e restaurar a matriz extracelular (Buckwalter et al., 2005).

3.1.1.1. A fisiopatologia da DDA

A existência de alterações a nível articular induz a perda de estabilidade da articulação, com o consequente aumento das cargas fisiológicas ou tensão de cisalhamento exercidas sobre algumas porções da cartilagem articular normal, resultando em alterações anatómicas e bioquímicas da região (Bennett, 2010a; Piermattei et al., 2006).

As primeiras alterações na DDA incluem o desgaste da zona superficial da cartilagem articular, caracterizada pelo rompimento da rede de colagénio, pela perda de proteoglicanos (evidenciada pela diminuição da intensidade de coloração indicativa de proteoglicanos nas zonas superficial e de transição), pela invasão da linha basófila que faz a transição entre a zona calcificada e a não calcificada por vasos sanguíneos provenientes do osso subcondral e pela remodelação do osso subcondral, embora, a exacta sequência dos eventos patológicos permaneça ainda pouco clara (Buckwalter et al.; 2005; Espanha, 2010; May, 1994; Poole et al, 2002). A relação temporal entre a existência de lesão no osso subcondral, a inflamação crónica do tecido sinovial e a destruição da cartilagem articular permanece ainda desconhecida (Kapoor et al., 2011). Alguns estudos afirmam que este endurecimento do osso subcondral como resultado de um processo de remodelação precede e causa a degeneração da

cartilagem articular cuja progressão requer o aumento da rigidez do osso subcondral. Por outro lado, outros estudos afirmam que é a perda de cartilagem articular que conduz a processos de remodelação óssea, os quais têm como resultado o aumento de picos de tensão exercidos sobre o osso subcondral. Ainda não é claro qual destas teorias é a correcta, ou mesmo se alguma delas está totalmente correcta (Buckwalter et al., 2005), contudo o que se verifica é que a degeneração da cartilagem articular e a remodelação do osso subcondral estão ambos presentes quando o paciente apresenta sinais e sintomas como dor articular, restrição de movimentos, crepitação articular, efusão e deformação articular, os quais se associam à perda da cartilagem articular conduzindo directamente à perda de função por parte da articulação. (Buckwalter et al., 2005).

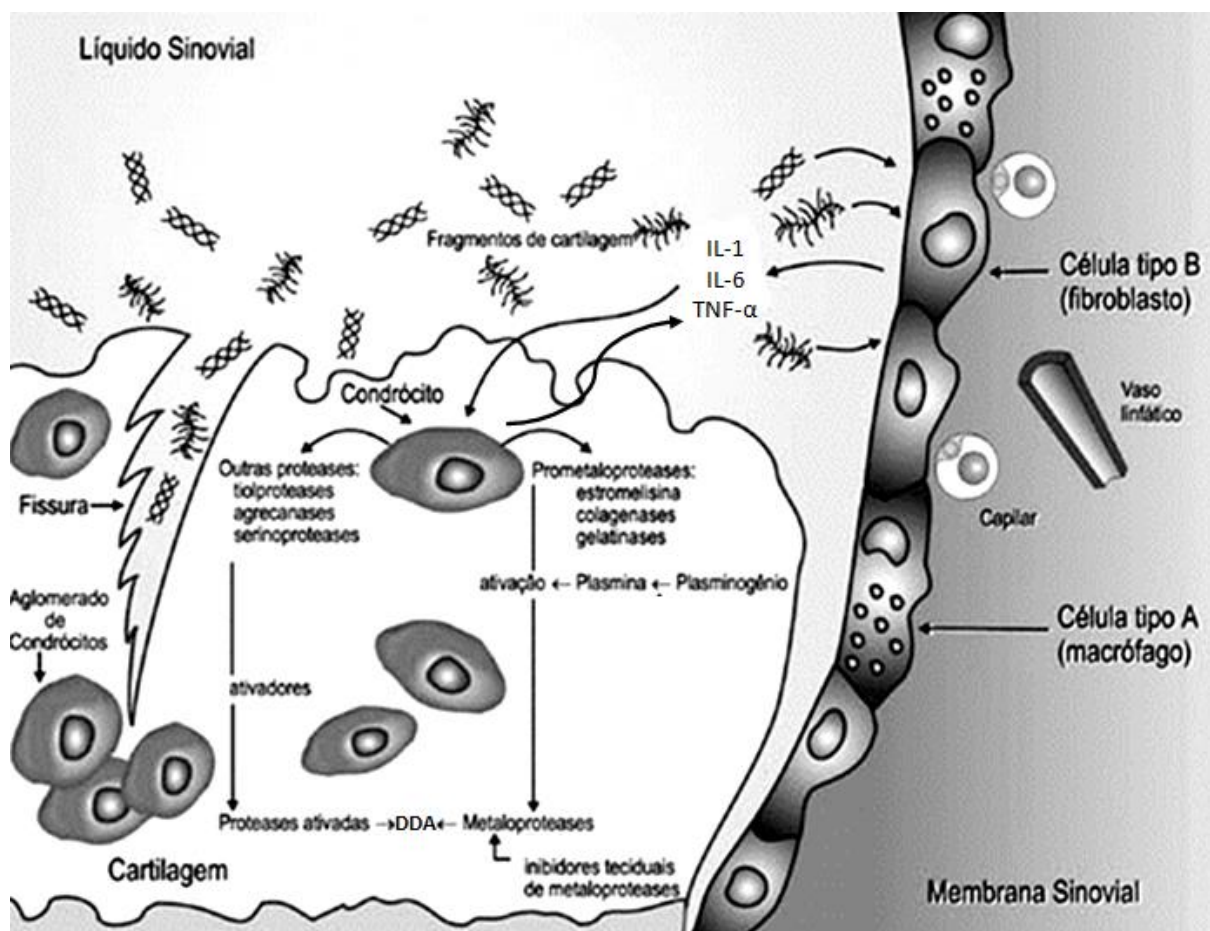
Na superfície da cartilagem articular as primeiras alterações visíveis consistem no aparecimento de fissura ou no rompimento das camadas mais superficiais. À medida que a doença degenerativa evolui, as irregularidades dão origem a fendas tornando a superfície articular mais áspera e cada vez mais irregular. As fissuras tendem a tornar-se cada vez mais profundas podendo mesmo atingir o osso subcondral. O aparecimento de fissuras cada vez mais profundas induz a libertação de fragmentos cartilagíneos para o espaço articular o que torna a cartilagem articular cada vez menos espessa. A degradação enzimática dos constituintes da matriz extracelular contribui para a diminuição ainda maior do volume da cartilagem (Buckwalter et al., 2005; Poole et al., 2002), tornando o osso subcondral cada vez menos protegido das forças mecânicas, o que eventualmente conduz a eburnação do osso subcondral, em que as superfícies desprotegidas do osso articular contactam e raspam umas nas outras tornando-as lisas e aumentando a sua densidade (Buckwalter et al., 2005).

A grande maioria dos mecanismos responsáveis pela perda progressiva da cartilagem articular na doença degenerativa articular (Figura 4) permanecem ainda desconhecidos, mas o processo pode ser dividido em 3 fases que se sobrepõem: 1) lesão ou alteração da matriz da cartilagem articular, 2) resposta dos condrócitos à lesão tecidual e 3) diminuição da capacidade sintética dos condrócitos com perda progressiva de tecido (Buckwalter et al., 2005; Goldring, 2000).

Na PRIMEIRA FASE a rede de macromoléculas da matriz extracelular é rompida ou alterada a nível molecular, com conseqüente aumento do teor de água na matriz. Estas alterações ocorrem anteriormente ou em simultâneo com o aparecimento das primeiras fissuras ao nível da superfície da cartilagem articular (Buckwalter et al., 2005). Existe uma diminuição da concentração dos proteoglicanos e alterações na sua composição (Pearle et al., 2005), cuja grande maioria se encontra na forma não agregada (Bennett, 2010a; Buckwalter et al., 2005; Goldring, 2000) e o comprimento dos glucosaminoglicanos está diminuído. Uma das conseqüências deste desarranjo na estrutura dos proteoglicanos é o aumento da

permeabilidade da matriz extracelular, o que facilita a entrada de água e a movimentação de outras moléculas para dentro desta. Este aumento do teor de água reflecte-se numa diminuição na capacidade de compressão e na diminuição da rigidez da matriz extracelular (Buckwalter et al., 2005; Pearle et al., 2005). Ao contrário dos proteoglicanos em que existe uma perda relativamente rápida, o colagénio aparentemente mantém a sua concentração, contudo a sua organização tridimensional é gravemente perturbada, existindo alterações nas relações normais do colagénio tipo II com os outros tipos de colagénios que desempenham um papel importantes para a estabilização da rede de colagénio. Isto resulta numa diminuição na capacidade de resistência a força de tracção. (Bennett, 2010a; Buckwalter et al., 2005; Goldring, 2000; Pearle et al., 2005). Todas estas alterações resultam num aumento da vulnerabilidade da cartilagem articular a futuras lesões mecânicas (Buckwalter et al., 2005).

Figura 4 - Esquema representativo da fisiopatologia da degradação da cartilagem articular, conducente ao aparecimento da doença degenerativa articular. (Adaptado de Sutton et al., (2009)).



Esta primeira fase pode ocorrer como resultado de uma grande variedade de agressões que incluem impactos de grande intensidade, elevadas forças de torção na articulação, inflamação articular ou outro tipo de agressões semelhantes que acelerem a degradação da matriz extracelular, ou que conduzam a alterações metabólicas ao nível da cartilagem articular os quais interferem com a capacidade dos condrócitos manterem a matriz (Buckwalter et al., 2005).

A SEGUNDA FASE inicia-se quando os condrócitos detectam as lesões da matriz através de alterações na osmolaridade, na densidade e na tensão (Buckwalter et al., 2005), o que faz com que libertem mediadores que estimulam uma resposta celular rápida. Na tentativa de resposta às alterações detectadas os condrócitos reagem através da síntese de novos constituintes da cartilagem como os proteoglicanos e o colagénio tipo II, mas também através de uma fase degradativa em que produzem enzimas do tipo proteases, cuja função é degradar os elementos que constituem a matriz de modo a tentar eliminar elementos danificados. Na cartilagem normal existe um equilíbrio entre estes dois tipos de elementos, os anabólicos e os catabólicos, o que é indispensável para a correcta renovação da cartilagem. Na condição de DDA esse equilíbrio perde-se e a actividade anabólica é incapaz de acompanhar o ritmo da actividade catabólica, resultando na degeneração da cartilagem (Bennett, 2010a; Buckwalter et al., 2005; Sandell & Aigner, 2001). É no momento em que surge esta incapacidade de estabilizar a lesão que se inicia a TERCEIRA FASE, que se caracteriza pela perda progressiva de cartilagem articular com o conseqüente declínio da resposta anabólica e proliferativa dos condrócitos (Buckwalter et al., 2005). Além das características intrínsecas da própria cartilagem articular (ser um tecido avascular, diminuída capacidade proliferativa dos condrócitos e de estes se encontrarem imóveis na matriz extracelular), que contribuem para a diminuída capacidade regenerativa da cartilagem articular, comparativamente com outros tecidos (Ross, & Pawlina, 2006), existem nesta fase outras alterações que também contribuem para esse factor, tais como a morte dos próprios condrócitos provocada por lesões mecânicas (pois como existem alterações na estrutura da matriz extracelular os condrócitos deixam de estar protegidos por uma matriz funcional) e por desregulação da resposta dos próprios condrócitos às citocinas anabólicas (Buckwalter et al., 2005).

As alterações no osso subcondral acompanham a degeneração da cartilagem articular, traduzindo-se pelo aumento da densidade do osso subcondral ou esclerose subcondral, pela formação de osteófitos e ainda de quistos subcondrais (contudo pouco frequentes nos cães) (Buckwalter et al., 2005; Piermattei et al., 2006; Sandell & Aigner, 2001). A esclerose do osso subcondral ocorre nas zonas onde existe erosão cartilaginosa, pois onde anteriormente o osso estava protegido pela cartilagem passa agora a receber uma maior quantidade de forças

físicas, adaptando-se assim por meio de um aumento da sua densidade resultante da formação de novas camadas ósseas nas trabéculas já existentes (Buckwalter et al., 2005). Na fase final da DDA a cartilagem articular já está completamente perdida ficando apenas o osso subcondral exposto, sofrendo polimento e adquirindo um aspecto semelhante a marfim ou mármore (Piermattei et al., 2006), provocando deformidades, instabilidade e espessamento articular (Buckwalter et al., 2005; May, 1994). Na maioria das articulações a formação e crescimento de osteófitos acompanha a evolução da própria doença (Sandell & Aigner, 2001), resultando da libertação de citoquinas anabólicas, as quais estimulam a proliferação celular e a formação de matrizes ósseas e cartilagíneas, desenvolvendo-se geralmente na periferia articular. Os osteófitos marginais surgem na zona de transição entre a cartilagem articular e o osso, enquanto os osteófitos capsulares surgem tipicamente nos locais de inserção da capsula (Buckwalter et al., 2005). Há ainda a referir a existência de osteófitos centrais que correspondem a projecções ósseas intra-articulares que emergem da superfície articular. Os osteófitos podem ser de natureza fibrosa, cartilagínea ou óssea, sendo a maioria dos osteófitos marginais cartilagíneos. A presença de osteófito é responsável pela restrição de movimentos do doente e contribui para o aparecimento e potenciação de dor aquando da movimentação (Buckwalter et al., 2005).

A perda da cartilagem articular, contribui também para alterações ao nível da membrana sinovial, ligamentos, cápsula articular e músculos peri-articulares, os quais com o tempo contraem e conduzem à diminuição da amplitude de movimentos articulares o que contribui para a atrofia dos muscular regional (Buckwalter et al., 2005).

3.1.1.1.1. As Protéases da Matriz Extracelular

A degradação dos vários componentes da matriz extracelular da cartilagem é conseguida graças à acção de várias protéases, a grande maioria delas sintetizadas pelos condrócitos e sinoviócitos, em resposta a estímulos inflamatórios (Mort & Billington, 2001).

As protéases que participam neste processo podem ser divididas em 5 classes: serina protéases, cisteína protéases, protéases aspartática, metaloproteínases e agrecanases. (Mort & Billington, 2001; Sandell & Aigner, 2001). Contudo, os dados actuais indicam que são as metaloproteínases as responsáveis pelo início da degradação da matriz extracelular. Esta classe de enzimas é caracterizada pela presença de um ião metálico no local activo, geralmente o zinco, necessário para a sua actividade catalítica. (Mort & Billington, 2001).

A grande maioria das enzimas peptídicas são relativamente pequenas, pesando cerca de 30kDa, e apresentando um local activo onde se ligam apenas seis aminoácidos do substrato. As metaloproteínases da matriz (MMP) mais complexas podem apresentar vários domínios

(onde estão presentes proteínas adicionais), que lhes conferem funções adicionais, como o auxílio na ligação ao substrato através da ligação em locais remotos de onde ocorre a clivagem da ligação peptídica e orientam a posição da enzima de modo a que esta possa ser funcional (Mort & Billington, 2001).

As MMPs formam uma família multigenética que de acordo com base na estrutura do seu domínio degradativo e na selectividade para o substrato podendo ser classificadas em várias subfamílias (Mort & Billington, 2001) entre elas as: 1) colagenases (MMP-1, /-8 e /-13), 2) gelatinases (MMP-2, /-9), 3) estromelinas (MMP-3) e 4) MMPs de tipo membranar (MT-MMPs) (Mort & Billington, 2001; Poole et al., 2002; Sandell & Aigner, 2001). Destas, as colagenases desempenham um papel muito importante e específico, já que são as únicas enzimas capazes de clivar o colagénio (Mort & Billington, 2001), em particular a MMP-13 que é considerada a colagenase mais importante na cartilagem pois tem a capacidade de degradar o colagénio tipo II (Mort & Billington, 2001; Poole et al., 2002; Sandell & Aigner, 2001). Esta clivagem da tripla hélice do colagénio ocorre tipicamente na ligação Gly794-Leu795, dando origem a dois fragmentos, um com 3/4 e outro com 1/4 do tamanho da molécula original (Garvian, Vaughan-Thomas, Innes & Clegg, 2010). Após esta clivagem inicial a tripla hélice pode ser desenrolada, permitindo o ataque de outras proteases, como as gelatinases. Os mecanismos enzimáticos do catabolismo do colagénio são complexos e não estão completamente conhecidos e é provável que estejam envolvidas várias enzimas em diferentes períodos e sobre diferentes circunstâncias (Garvian et al., 2010; Mort & Billington, 2001). No entanto, a clivagem das fibrilhas de colagénio inicia-se com a eliminação de pequenos proteoglicanos e a quebra de ligações cruzadas interfibrilares de modo a que as colagenases tenham acesso às diferentes regiões da tripla hélice.

Elementos adicionais nas gelatinases, nomeadamente as repetições de fibronectina tipo II e o domínio de hemopexina, auxiliam a proteólise através da ligação ao substrato, permitindo também que se ligue a outros componentes da matriz extracelular (Mort & Billington, 2001). As estromelinas não apresentam uma grande especificidade de substratos, pelo que são capazes de degradar muitas das proteínas da matriz extracelular, incluindo os proteoglicanos, gelatinas, fibronectina e colagénio tipo IX (Mort & Billington, 2001). As metaloproteínases do tipo membranar (MT-MMPs) são um subgrupo caracterizado por conter um domínio C-terminal transmembranar, assim como pela capacidade de degradar uma variedade elevada de componentes da matriz. (Mort & Billington, 2001).

Em condições normais existe um grande controlo na síntese, activação e actividade das MMP, pelo que todas as MMP são sintetizadas como pró-enzimas inactivadas, ou seja como zimogénios, onde a latência da enzima é mantida através da sua ligação a um resíduo de

cisteína no prodomínio do local dos íons zinco. A sua activação ocorre já na matriz extracelular através de uma complexa cascata proteolítica altamente controlada que conduz à destabilização dessa ligação cisteína-zinco, seguida de uma segunda clivagem que resulta na libertação do prodomínio da enzima activa. Na matriz existe também uma forma de controlar a actividade das MMP, através da acção de inibidores naturais designados por inibidores tecidulares das MMP (ITMP), que são sintetizados pelos condrócitos e sinoviócitos, que se ligam fortemente ao domínio activo das MMP activas, inibindo-as (Bennett, 2010a; Denny & Butterworth, 2000; Mort & Billington, 2001). Na cartilagem normal a renovação da matriz é controlada por um estreito equilíbrio entre as várias MMPs e os inibidores tecidulares das MMP (ITMP). Na DDA a actividade das MMP está substancialmente aumentada, a homeostasia está perdida e ocorre a destruição de cartilagem articular (Bennett, 2010a; Buckwalter et al., 2005; Sandell & Aigner, 2001). No que diz respeito às Agrecanases, elas fazem parte de uma família de protéases designada de Desintegrina-metaloproteinase com domínios de trombospondina (ADAMTS), sendo responsáveis pela degradação dos agrecanos. As mais importantes são as agrecanases-1 e -2. (Goldring, 2012; Mort & Billington, 2001; Sandell & Aigner, 2001), as quais além de apresentarem um domínio activo dependente do zinco (como as metaloproteinases) têm também um domínio de desintegrina e um ou dois domínios do tipo trombospondina-I, através do qual têm a capacidade de se ligar com os GAGs sulfurados (Mort & Billington, 2001), nomeadamente ao sulfato de condroitina (Sandell & Aigner, 2001). Por fim os membros da classe cisteína protéases e protéases aspartática, também são importantes na degradação da matriz da cartilagem, pois degradam o colagénio e os proteoglicanos previamente fragmentados por outras protéases (Mort & Billington, 2001).

Este aumento da actividade enzimática responsável pela degradação da cartilagem articular é estimulado pela libertação de citocinas pro-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e factor de necrose tumoral α (TNF- α) (Bennett, 2010a; Kapoor et al., 2011; Mort & Billington, 2001).

3.1.1.1.2. As Citocinas Pró-inflamatórias

Na DDA existe um aumento da expressão de citocinas inflamatórias, das quais se destaca o factor de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e ineterleucina-6 (IL-6) que são sintetizadas pelos sinoviócitos tipo A e pelos fibroblastos da membrana sinovial mas também pelos condrócitos, (Bennett, 2010a; Goldring, 2000; Sandell & Aigner, 2001). Os seus níveis estão aumentados no líquido sinovial, na membrana sinovial, no osso subcondral e na cartilagem articular nos animais com DDA (Kapoor et al., 2010). As citocinas pró-

inflamatórias têm uma acção sobre os condrócitos, estimulando-os a aumentar a síntese de proteases e de outras citocinas e mediadores pró-inflamatórios (Bennett, 2010a; Goldring, 2000) além de diminuírem a síntese de enzimas inibidoras das MMP e reduzirem o nível de síntese do colagénio e proteoglicanos da matriz extracelular (Pearle et al., 2005; Sandell & Aigner, 2001). De todas elas parece que a IL-1 é a que apresenta maior responsabilidade na destruição da cartilagem articular, pois estimula a produção de MMP e que o TNF- α é o principal impulsor de processo inflamatório. A IL-6 é responsável pelo aumento do número de células inflamatórias no tecido sinovial e aumenta o efeito da IL-1 na síntese de MMP e na produção de proteoglicanos (Pearle et al., 2005). As citocinas pró-inflamatórias podem actuar de forma independente ou em concertação com outras citocinas, de modo a iniciar e propagar a resposta inflamatória (Kapoor et al., 2010). No entanto, existem outros elementos como a IL-8, IL-17, IL-18 e o factor inibidor de leucemia (Goldring, 2000), IL-15, IL-21 (Kapoor et al., 2011), que também apresentam características pró-inflamatórias.

3.1.1.1.3. As Citoquinas Anti-inflamatórias

Da mesma forma como na DDA existe um aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias, as anti-inflamatórias também estão aumentadas como forma de tentar controlar a inflamação provocada pelas primeiras. As citocinas anti-inflamatórias principais são a IL-4, IL-10, IL-13. Elas têm uma acção de condroprotecção e actuam inibindo a síntese de IL-1 e TNF- α , entre outras acções (Sutton et al., 2009).

3.1.1.1.4. Outros participantes na degradação da cartilagem

Outros factores moleculares apresentam influência na degradação da cartilagem, é o caso dos fragmentos de fibronectina que resultam da própria degradação da cartilagem através da capacidade de induzir a expressão de MMP por parte dos condrócitos (Poole et al., 2002; Sandell & Aigner, 2001). O monóxido de azoto (NO) também está aumentado nos casos de DDA, tendo sido implicado como mediador biológico através da capacidade que têm em inibir a síntese de proteoglicanos e a resposta dos condrócitos ao IGF-1, além de ser importante para a indução da apoptose dos condrócitos e sinoviócitos, aumenta a produção de MMP (Sandell & Aigner, 2001).

3.1.2. Neoplasia articular

Os tumores articulares primários são pouco frequentes e quando presentes são na sua maioria malignos. O mais frequente é o sarcoma sinovial, mas tumores como o fibrossarcoma ou osteossarcoma também podem invadir a articulação a partir de tecidos peri-articulares. É

importante distinguir condições benignas como osteocondromatose sinovial no cão ou a hipovitaminose A no gato das neoplasias malignas. O diagnóstico pode ser feito através do recurso à imagem radiográfica e à biópsia, a qual é essencial para confirmação de diagnóstico (Denny & Butterworth, 2000).

3.2. Doenças Articulares Inflamatórias

As doenças articulares inflamatórias causadas por agentes infecciosos ou por factores imunológicos (pelo que podem ser subdivididas em infecciosas e não infecciosas), não são raras no cão e no gato, mas surgem com uma frequência relativamente baixa na prática clínica (Piermattei et al., 2006). Caracterizadas por uma inflamação da membrana sinovial com consequentes alterações do líquido sinovial e elevadas contagem de leucócitos no mesmo (Bennett, 2010b), associadas clinicamente a uma claudicação podendo também existir sinais sistémicos como febre, letargia, anorexia e leucocitose.

3.2.1 Doenças Articulares Infecciosas (Artrites)

Uma grande variedade de agentes infecciosos que incluem bactérias, fungos, vírus e protozoários podem causar infecção da articulação. Geralmente atingem apenas uma articulação, mas alguns tipos de infecções menos frequentes podem chegar contudo a atingir mais do que uma (Bennett, 2010b). Assim consideram-se: artrites bacterianas, por espiroquetas e fúngicas.

3.2.1.1. Artrite séptica (Bacteriana)

A artrite séptica bacteriana é uma artropatia inflamatória caracterizada pela presença de bactérias na membrana sinovial e/ou no líquido sinovial, observadas em avaliação citológica ou por cultura bacteriana. Os agentes mais comuns são *Streptococcus* spp. β hemolíticos, *Staphylococcus* spp, *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp, e *Erysipelothrix* spp (Clements et al., 2005; Denny & Butterworth, 2000) e os menos frequentemente incluem o *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Brucella* e *Pseudomonas* spp. e organismos anaeróbios (Bennett, 2010b). Em alguns casos podem verificar-se infecções mistas com bactérias aeróbias e anaeróbias. É uma condição clínica provocada quase sempre por inoculação bacteriana directamente na articulação através de feridas penetrantes, corpos estranhos e contaminação iatrogénica (através de procedimentos cirúrgicos ou injeções intra-articulares com material contaminado) (Schulz, 2007). A infecção articular também pode ocorrer secundariamente a infecções sistémicas através de disseminação hematogénica a partir de infecções cutâneas, quistos, pielonefrites, prostatites, peritonites, pneumonias e endocardites (Abercromby, 1994; Schulz,

2007). Normalmente a condição tende a atingir apenas uma articulação, ocorrendo poliartrites em situações de septicémia decorrentes de endocardite ou onfaloflebite (Abercromby, 1994).

As artrites bacterianas podem afectar indivíduos de todas as idades, sendo contudo as raças de grande porte as mais frequentemente afectadas, com preferência para os machos (Bennett, 2010b). Inicialmente a infecção causa inflamação da membrana sinovial e promove o extravasamento de fibrina, factores de coagulação, leucócitos polimorfonucleares e o aparecimento de fluido seroso proteináceo na articulação (Schulz, 2007). Estas alterações reflectem-se no líquido sinovial, com um aumento do número de células (principalmente de leucócitos polimorfonucleares) em resposta à presença de agentes bacterianos (Abercromby, 1994). Os leucócitos reagem rapidamente à infecção e ao fagocitarem as bactérias libertam enzimas lisossomais e protéases que além de terem acção no controlo do agente também têm acção sobre a cartilagem articular, contribuindo para a degradação da matriz extracelular expondo as fibras de colagénio o que vai permitir uma degradação enzimática ainda maior. Além do mais, as próprias bactérias também libertam toxinas com acção na degradação da cartilagem articular. (Abercromby, 1994).

A destruição enzimática da matriz extracelular e o trauma mecânico da cartilagem afectada, conduzem à perda da superfície articular, podendo mesmo o processo infeccioso atingir o osso subcondral e desencadear uma osteomielite bacteriana (Schulz, 2007). O grau de lesão da cartilagem articular depende do tipo do agente infeccioso, da extensão e da cronicidade da infecção (Abercromby, 1994). Clinicamente estes doentes apresentam claudicação e intolerância à sobrecarga no membro afectado. O exame físico objectivo pode revelar feridas penetrantes devido a mordedura, corpos estranhos, evidência de traumas ou cirurgias articulares anteriores. A articulação afectada apresenta edema, dor, rubor e pode existir crepitação à sua manipulação. Poliartrite ou sinais sistémicos como pirexia, anorexia, leucocitose e perda de peso estão presentes, mas apenas numa pequena percentagem, sendo mais frequentes em casos de septicémia associadas a endocardite ou onfaloflebites (Abercromby, 1994).

Os sinais radiográficos estão dependentes da fase em que se encontra a doença, sendo os sinais precoces a efusão articular e o edema dos tecidos moles regionais; e nas fases mais avançadas, reacção periósticas e mesmo calcificação da cápsula articular. Irregularidades mais ou menos marcadas no osso subcondral, associadas a zonas de esclerose (Bennett, 2010b) são alterações não específicas e que podem ser confundidas com outros tipos de condição como a DDA e artrite erosiva (Abercromby, 1994). Contudo apenas a identificação ou cultura do agente no líquido sinovial é que permite estabelecer um diagnóstico definitivo (Abercromby, 1994), que deverá ser o mais precoce para limitar não só as alterações articulares uma vez que

estas são irreversíveis e também para evitar o uso de terapêutica inapropriada como medicamentos imunossupressores que agravam ainda mais a infecção (Denny & Butterworth, 2000; Schulz, 2007).

3.2.1.2. Artrite decorrente de Doença de Lyme

A doença de Lyme é uma doença vectorial zoonótica transmitida por carrças, causada por uma espiroqueta do tipo *Borrelia burgdorferi* transmitida por carrças do género *Ixodes* (Abercromby, 1994). Clinicamente caracteriza-se por uma claudicação aguda associada a uma monoartrite ou poliartrite que pode ser migratória. Os episódios de claudicação duram relativamente pouco tempo e podem ser recidivantes. Outros sinais clínicos também presentes são: sinais neurológicos, cardíacos e renais, podendo verificar-se pirexia e linfadenopatia (Abercromby, 1994; Bennett, 2010b). A(s) articulação(ões) afectada(s) pode(m) apresentar-se radiograficamente normal(ais), ou com algum edema dos tecidos moles peri-articulares (Abercromby, 1994). De difícil diagnóstico, a doença de Lyme é actualmente detectada com recurso a testes serológicos, os quais apresentam a desvantagem de uma elevada percentagem de falsos-positivos e falsos-negativos (Piermattei et al; 2006). Cerca de 20% de cães clinicamente normais com história de mordida por ixodídeos são seropositivos a *B. burgdorferi*, por isso a simples presença de anticorpo séricos anti-*Borrelia*, num animal que apresenta claudicação é insuficiente para o estabelecimento do diagnóstico (Bennett, 2010b), o qual terá de ser baseado na história pregressa, sinais e sintomas, serologia e resposta à terapêutica.

3.2.1.3. Artrite por Hemoprotozoários

A *Rickettsia rickettsii* é o agente causador da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, sendo transmitido pela picada de ixodídeos do género *Dermacentor* (endémico nas regiões centrais e leste dos Estados Unidos da América) (Schulz, 2007), é um dos agentes hematológicos à qual pode estar associada uma condição de artrite. A poliartrite pode ser apenas um dos sinais clínicos de um cenário muito mais amplo (Bennett, 2010b). De igual modo, algumas artrites a *Ehrlichia* spp. podem estar presentes na causa de artrite, sendo o agente transmitido através da picada de ixodídeos *Rhipicephalus sanguineus* (Bennett, 2010b). Os sinais clínicos associados à Erliquiose podem ser agudos ou crónicos e incluem febre, anorexia, linfadenopatia, esplenomegália, hepatopatias, perda de peso, claudicação, dor articular, petéquias e/ou sinais neurológicos. Radiograficamente as alterações podem incluir efusão articular e edema dos tecidos moles peri-articulares com as superfícies ósseas e cartilagueas ainda sem alterações (Schulz, 2007).

3.2.1.4. Artrite por *Mycoplasma*

A infecção da articulação com *Mycoplasma* spp. pode ocorrer por disseminação do organismo a partir de infecções activas ou latentes nas membranas mucosas das vias respiratórias, tecido conjuntivo e tracto urinário, sendo mais provável de ocorrer apenas em indivíduos debilitados ou imunodeprimidos. Infecções com *Mycoplasma spumans* estão associadas a poliartrite em cães jovens da raça Galgo Inglês. O diagnóstico realiza-se com a identificação do agente em esfregaços de líquido sinovial corados com Giemsa, Wright ou Leishmann (Abercromby, 1994).

3.2.1.5. Artrite por Fungos

A artrite causada por fungos é bastante rara, sendo a maioria dos casos uma extensão de osteomielite fúngica. Nas infecções fúngicas da articulação podem estar presentes uma grande variedade de agentes, que incluem *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Filobasidiella (Cryptococcus) neoformans*, *Sporotrichum schenckii* e *Aspergillus terreus* que são observados em esfregaços de líquido sinovial ou identificados através de cultura (Bennett, 2010b).

3.2.1.6. Artrite por Protozoários

A leishmaniose, provocada pelo protozoário *Leishmania infantum* (Europa), transmitidas por insectos vectores, também podem provocar artrites. Além da poliartrite os sinais clínicos podem incluir um quadro de perda de peso, letargia, lesões cutâneas, linfadenopatias, hepatomegália, esplenomegália e febre (Abercromby, 1994). As articulações afectadas apresentam uma sinovite associada a uma infiltração de grande número de macrófagos cheios de corpos de *Leishmania* no seu interior. O diagnóstico é feito através da observação desses corpos de *Leishmania* dentro de macrófagos em aspirados de linfonodos ou medula óssea. O Rx pode não mostrar qualquer tipo de alteração.

3.2.1.7. Artrite Viral

O Calicivirus pode provocar uma verdadeira artrite infecciosa em gatos, principalmente nos que vivem em ambiente de gatil (Bennett, 2010b).

3.2.2. Doenças Articulares Não Infecciosas (Artrites Imunomediadas)

As artrites imunomediadas são definidas como doenças inflamatórias onde o sistema imune tem um papel importante na patogenia da doença, através da formação de complexos imunes e do fenómeno da auto-imunidade (Bennett, 2010b). Neste tipo de artrite a cultura de

microrganismos é sempre negativa, muito embora não se possa excluir o seu envolvimento no desenvolvimento da doença. Grande parte do conhecimento deste tipo de artrite provém da Medicina Humana, onde a doença é comum e potencialmente incapacitante ou fatal para o indivíduo (Piermattei et al., 2006). A formação dos complexos imunes em resposta a infecção por agentes microbianos na própria articulação ou sistemicamente com subsequente deposição na articulação é uma das hipóteses para explicar a formação de complexos imunes, o transporte de antígenos microbianos para a articulação, com consequente resposta imune é outra das hipóteses. Da mesma forma, também antiglobulinas (factor reumatóide) podem estar envolvidas na formação de complexos imunes. Potencialmente os antígenos podem ter outra origem que não a microbiana, como antígenos tumorais e antígenos ou haptenos relacionados com fármacos (Bennett, 2010b). Os complexos imunes (resultantes de reacções de hipersensibilidade do tipo III), depositam-se na membrana sinovial e têm uma grande capacidade de estimular os mediadores inflamatórios, por meio da fixação do sistema de complemento e subsequente infiltração da membrana sinovial por células inflamatórias. Os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α estão aumentados, sendo uns dos responsáveis pela estimulação da produção de MMP que participam na degeneração da cartilagem articular. Estas citocinas difundem-se da membrana sinovial para a cartilagem articular e vice-versa (Hay & Manley, 2006). É provável que certos indivíduos apresentem predisposição genética para artrites imunomediadas, nomeadamente devido a variações genéticas na resposta imunitária do indivíduo. É conhecido que certos alelos do complexo de maior histocompatibilidade (MHC), em particular de DLA-DRB1, têm sido associados ao aumento do risco de artrite imunomediada no cão (Bennett, 2010b). Ao contrário das artrites infecciosas as imunomediadas atingem geralmente mais que uma articulação e podem ser classificadas do ponto de vista radiográfico e histológico em duas categorias: 1) Erosivas ou 2) Não Erosivas dependendo da presença ou ausência de alterações erosivas na cartilagem articular (Abercromby, 1994).

3.2.2.1. Doenças Articulares Erosivas

Estas são doenças imunomediadas poliarticulares, que de acordo com o próprio nome apresentam uma destruição da cartilagem articular. Radiograficamente são visíveis lesões erosivas ao nível da superfície articular e do osso subcondral, o qual apresenta uma diminuição da densidade das trabéculas ósseas. Trata-se de um processo destrutivo progressivo (Bennett, 2010b; Goldstein, 2010; May & Bennet, 1994).

3.2.2.1.1. Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide é uma artropatia inflamatória, que afecta em simultâneo várias articulações, com uma etiologia desconhecida e que se caracteriza pela destruição crónica e erosiva das articulações (May & Bennet, 1994). Descrita pela primeira vez no cão em 1969 (Tiu, Suter, Fischer & Dorfman, 1969), é uma doença pouco frequente nesta espécie (Denny & Butterworth, 2000), afectando principalmente indivíduos adultos geralmente com mais de 5 anos de idade (Bennett, 2010b; Schulz, 2007).

A patogenia exacta da artrite reumatóide é ainda desconhecida, sendo que por algum motivo existe uma alteração na imunoglobulina G (IgG) endógena que vai estimular a produção de anticorpos IgG e IgM. Estes anticorpos, também conhecidos como factores reumatóides ligam-se à fracção Fc (fracção constante das imunoglobulinas, responsável pela sua actividade biológica) da IgG e formam complexos imunes que se depositam na membrana e no líquido sinovial, conduzindo à activação do sistema de complemento (Feldmann, Brennan & Maini, 1996; May & Bennet, 1994). Ocorre assim uma intensa migração celular de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células dendríticas para a membrana sinovial, mas também para o líquido sinovial. A espessura da membrana celular aumenta, existe uma neovascularização acentuada e deposição de tecido de granulação sobre a membrana sinovial (*pannus*) que tende a invadir a cartilagem articular. A cartilagem articular coberta pelo *pannus* está assim sujeita à acção intensa de MMP produzidas por células que constituem o *pannus* em resposta às citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e TNF- α , apresentado por isso uma destruição da cartilagem articular, a qual em casos mais graves pode mesmo atingir o osso subcondral (Feldmann et al., 1996; May & Bennet, 1994). Os sinais clínicos podem ser bastantes variáveis de doente para doente, apresentando contudo sempre na sua história clínica referencia a claudicação ou dificuldade de locomoção, geralmente em mais do que uma articulação. No exame objectivo, pode ser notória a instabilidade do carpo e tarso (ossos mais atingidos), os quais podem mesmo apresentar alguma deformidade (Schulz, 2007). Na imagem radiográfica, o sinal clássico de artrite reumatóide é a presença de irregularidades da superfície articular ou a existência de lesões líticas no osso, o que indica sempre destruição do osso subcondral. Também pode ser observado edema de tecidos moles, aumento do líquido articular, diminuição do espaço articular e em alguns casos presença de osteófitos (Bennet, 2010a; Piermattei et al., 2006; Schulz, 2007). Em cerca de 75% dos casos de artrite reumatóide os níveis de factores reumatóides estão aumentados e a maioria apresenta valores normais de anticorpos antinucleares (ANA) (Denny & Butterworth, 2000).

3.2.2.1.2. Poliartrite progressiva crónica felina

Trata-se de uma doença imunomediada que afecta aparentemente apenas gatos do sexo masculino com uma idade compreendida entre 1,5 a 4,5 anos e sem predisposição rática (Goldstein, 2010; Schulz, 2007). É geralmente simétrica bilateral e afecta principalmente o tornozelo e o carpo, sendo pautada por uma proliferação marcada do periósteo, onde osso peri-articular neoformado é a principal característica. A erosão de osso subcondral é também visível em alguns casos. Os sinais clínicos e as alterações no líquido sinovial são semelhantes às encontradas em outras poliartrites imunomediadas. A doença é bastante semelhante à artrite reumatóide canina com a excepção que neste caso a número de articulações afectada é menor, e não existe factor reumatóide elevado em circulação (May & Bennet, 1994). A causa desta doença é ainda desconhecida, mas pode estar relacionada com a exposição do doente ao vírus formador de sincício felino (FeSFV) e ao vírus da leucemia felina (FeLV). Todos os gatos com esta doença são positivos para FeSFV e o FeLV é identificado em 60 % deles. Clinicamente a maioria dos gatos apresenta história de claudicação, relutância ao movimento, anorexia, dor, perda de peso e ocasionalmente algum grau de deformação da articulação afectada (Schulz, 2007).

3.2.2.1.3. Poliartrite erosiva dos galgos

Está descrito o desenvolvimento de uma condição de poliartrite erosiva em galgos com menos de três anos, que embora de causa desconhecida (Denny & Butterworth, 2000) se pense que o *Mycoplasma spumans* possa desempenhar um papel importante nesta doença (Abercromby, 1994; May & Bennet, 1994).

3.2.2.2. Doenças Articulares Não Erosivas

Estas são a forma mais comum de poliartrite imunomediada no cão e no gato, caracterizando-se pela deposição de complexos antigénio-anticorpo ao nível da membrana sinovial. As doenças articulares não erosivas estão descritas como sendo secundárias a doenças infecciosas crónicas auto-ímmunes como o Lupus Eritematoso Sistémico, a sinovites linfocíticas plasmocíticas, ao uso de determinados fármacos ou idiopáticas (Goldstein, 2010; Hay & Manley, 2006).

3.2.2.2.1. Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

O Lupus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença auto-ímmune idiopática multissistémica (Bennett, 2010b; Denny & Butterworth, 2000), que resulta da produção de anticorpos contra os eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Esta natureza multissistémica resulta numa grande

variedade de apresentações clínicas, sendo que na maioria dos casos estão sempre presentes sinais de febre e poliartrite inflamatória não erosiva simétrica. A deposição de complexos imunes na articulação, principalmente ao nível dos vasos sanguíneos da membrana sinovial é responsável pelo desencadeamento de resposta inflamatória (Bennett, 2010b). Outras manifestações incluem anemias hemolíticas imunomediadas, trombocitopénias imunomediadas, leucopénia, glomerulonefrite, dermatites, polimiosites, alterações no sistema nervo central, pleurites e doenças gastro intestinais (May & Bennet, 1994). O LES pode ocorrer tanto em canídeos como em felídeos e devido à grande variedade de sinais e sintomas clínicos o seu diagnóstico pode ser difícil (Bennett, 2010b). A avaliação das imagens radiográficas das articulações afectadas pode não revelar nenhuma alteração específica. A reacção perióstica é rara, mas o edema dos tecidos moles e efusão sinovial pode ser observado na maioria dos casos (May & Bennet, 1994). O LES é caracterizado pela presença em circulação de anticorpos antinucleares (ANA), grupo de auto-anticorpos contra o material constituinte do núcleo da célula, e embora os ANA estejam aumentados como são bastante inespecíficos, os títulos positivos podem estar associados a outras doenças. Por isso, alguns autores defendem que a quantificação dos ANA pode ajudar no diagnóstico, mas apenas quando revelam um título relativamente elevado. Outros defendem que devido à falta de especificidade dos ANA a sua avaliação não deve ser realizada (Bennett, 2010b).

3.2.2.2.2. Sinovite linfocítica plasmocítica

Trata-se de uma doença imunomediada caracterizada por uma infiltração de linfócitos e plasmócitos ao nível da membrana sinovial, sendo a articulação do joelho a mais afectada, conduzindo à degeneração e ruptura do ligamento cruzado anterior, instabilidade articular e/ou desenvolvimento da doença degenerativa articular (DDA) (Schulz, 2007). Os doentes apresentam geralmente claudicação uni ou bilateral dos membros pélvicos, com um início agudo ou com duração crónica, não apresentando normalmente sinais sistémicos (Schulz, 2007). O diagnóstico é feito através de biópsia da membrana sinovial onde é possível visualizar uma hipertrofia dos *villi* e a infiltração da membrana sinovial e do ligamento cruzado anterior por linfócitos e plasmócitos (Goldstein, 2010; Schulz, 2007). Afecta em particular cães da raça Pastor Alemão (Goldstein, 2010), Rottweiler (Schulz, 2007) e outras raças de grande porte.

3.2.2.2.3. Síndrome de poliartrite /polimiosite canina

Nesta síndrome a poliartrite é complicada pela presença de uma polimiosite, sendo mais comum em cães de raças Spaniel. Clinicamente, os animais apresentam rigidez marcada,

pouca tolerância ao exercício físico, atrofia muscular generalizada (associada a fibrose e contracturas) e nas primeiras fases pode mesmo haver edema muscular e dor. Afecta em particular o joelho e a articulação temporomandibular. O seu diagnóstico é confirmado através de biopsia realizada a diferentes músculos, no mínimo seis em que pelo menos dois revelem alterações inflamatórias. (Bennett, 2010b).

3.2.2.2.4. Síndrome poliartrite/meningite

Diagnosticada principalmente em raças Weimaraner, Terra Nova, Braco Alemão, Boxer, Corgi, Boieiro de Berna (Bennett, 2010b; Denny & Butterworth, 2000), caracteriza-se clinicamente pelo doente apresentar piroxia, rigidez e dor no pescoço. Em alguns casos podem mesmo estar presentes sinais nervosos (Bennett, 2010b; May & Bennet, 1994). A inflamação das meninges pode ser confirmada pela análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), onde existe um aumento da contagem de leucócitos, dos níveis de proteína e de creatinina. (May & Bennet, 1994).

3.2.2.2.5. Poliartrite nodosa

É uma forma extremamente rara de poliartrite no cão, caracterizando-se por uma infiltração fibrinosa em redor das arteríolas da membrana sinovial. Outros órgãos podem também ser afectados (Bennett, 2010b; May & Bennet, 1994).

3.2.2.2.6. Síndrome de poliartrite juvenil no Akita

Trata-se de uma poliartrite que afecta apenas cães da raça Akita com menos de 1 ano de idade, tem um componente hereditário e os sinais clínicos incluem dor cíclica, anemia hemolítica e ocasionalmente podem apresenta meningite (Bennett, 2010b; Hay & Manley, 2006).

3.2.2.2.7. Artrite inflamatória do Shar-Pey

Também conhecida como febre do Shar-Pey, afecta indivíduos desta raça de qualquer idade. Clinicamente caracteriza-se por episódios de febre e edema articular, principalmente no tarso. É uma doença autossómica recessiva. Em alguns dos animais também está presente a deposição de substancia amilóide (Bennett, 2010b; Hay & Manley, 2006).

3.2.2.2.8. Artrite induzida por fármacos

Consiste basicamente numa reacção de hipersensibilidade, que envolve a deposição de complexos fármaco-anticorpo em diferentes áreas do corpo, como as articulações (Bennett,

2010b; Goldstein, 2010). Os principais fármacos responsáveis por esta reacção são antibióticos pertencentes às sulfonamidas, lincomicina, eritromicina, cefalosporinas e penicilina (Bennett, 2010b). Os cães da raça Doberman Pinscher parecem ser particularmente susceptíveis à combinação de sulfadiazina-trimetoprim (Bennett, 2010b; Goldstein, 2010).

3.2.2.2.9. Reacções vacinais

Ocasionalmente, poliartrites imunomediadas podem ocorrer após vacinação, sendo mais provável de ocorrer na primovacinação (particularmente em gatinhos) (Bennett, 2010b). Os sinais clínicos são transitórios com uma duração de 24 a 48 horas e traduzem-se em claudicação, podendo surgir cinco a sete dias após a vacinação. O calicivirus parece ter um papel importante nesta condição uma vez que antigénios de calicivirus foram detectados em macrófagos da membrana sinovial e a presença destes antigénios está associada a sinovite activa (Bennett, 2010b; Goldstein, 2010).

3.2.2.2.10. Poliartrite idiopática

A Poliartrite idiopática inclui todos os casos de artropatia inflamatória que não podem ser inseridos nos outros grupos, sendo portanto um diagnóstico de exclusão. Não possuem uma causa identificada, mas presume-se que esteja relacionada com a formação de complexos imunes (Schulz, 2007), surgindo em indivíduos de qualquer idade, sendo mais frequentemente nas idades entre os 1 e 3 anos (Bennett, 2010b). Manifesta-se geralmente como sinovite aguda ou subaguda e ao Rx é possível ser detectado edema dos tecidos moles peri-articulares e/ou edema articular sem mais quaisquer alterações (Schulz, 2007). Podem ser divididas em quatro subcategorias (Bennett, 2010b): Tipo I- Artrites idiopáticas não complicadas, é a forma mais comum; Tipo II- Artrite idiopática associada a infecções distantes das articulações (artrite reactiva). As Infecções ocorrem frequentemente no tracto respiratório, tonsilas, tracto urinário, útero, pele e cavidade oral; Tipo III- Artrite idiopática associada a doenças gastrointestinais (artrite enteropática); Tipo IV- Artrite idiopática associada a neoplasia. A localização da neoplasia não tem qualquer relação com a articulação e muitas vezes apenas é detectada em exame *postmortem*, é o caso dos doentes com carcinoma das células escamosas, tumor da base do coração, leiomioma e adenocarcinoma mamário. Em gatos, estão associadas a doenças mieloproliferativas.

4. Diagnóstico da DDA

4.1. História e sinais clínicos

De igual modo às restantes áreas da clínica a abordagem ao caso deve iniciar-se sempre com a caracterização do doente e elaboração de uma boa história clínica, que considera também a identificação do membro afectado, a evolução do problema, o tipo de tratamentos realizados e a sua eficácia, período do dia em que há exacerbação dos sinais clínicos, relacionado com o exercício ou após um período de decúbito prolongado e alterações na claudicação de acordo com o clima (Schulz, 2007), de modo a dirigir o clínico para o diagnóstico. Geralmente nos animais com DDA a claudicação é muitas vezes mais perceptível para o dono após um período de repouso, em particular após exercício intenso, rigidez articular matinal também é um sinal frequente e é uma condição que é agravada pelo tempo frio e húmido. A dor crónica pode também tornar difícil para o doente deitar-se e adoptar uma posição antiálgica, podendo os proprietários notar que o animal está constantemente a mudar a sua posição antes de dormir (Houlton, 1994).

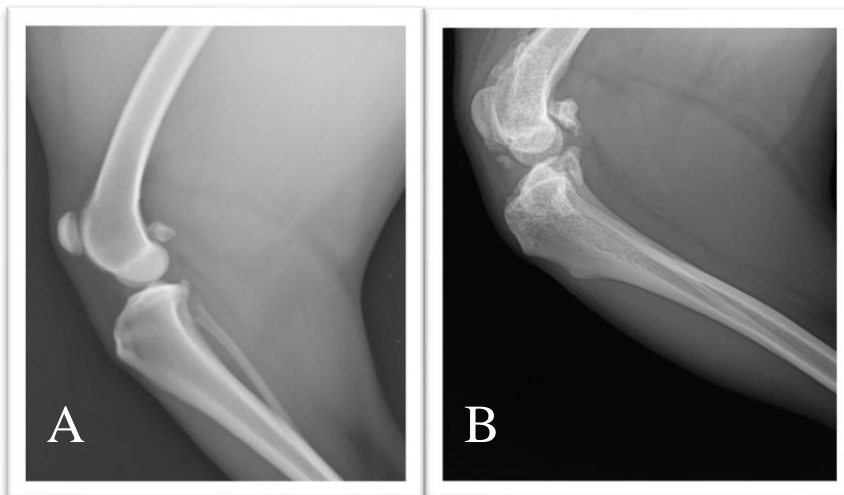
4.2 Técnicas de diagnóstico adicionais

4.2.1. Radiografia

A radiografia é possivelmente o meio de diagnóstico auxiliar mais utilizado, devido à sua disponibilidade, ao preço, à informação que proporciona, ao facto de ser um método simples e bastante rápido, tornando-se por isso uma primeira escolha nos casos de DDA (Bennett, 2010a). Para uma informação mais correcta sobre determinada região radiografada geralmente é necessário radiografar sobre dois planos visuais perpendiculares entre si, os planos ortogonais, em alguns casos podem ser necessários outros planos adicionais (oblíquos, flexionados ou sobre tensão) (Schulz, 2007). A gravidade dos sinais clínicos encontrados pode não estar necessariamente relacionada com o grau de claudicação que o animal apresenta (May, 1994), e a avaliação dos sinais radiográficos precoces de DDA corresponde normalmente a aumento da opacidade dos tecidos moles peri-articulares e/ou edema articular, por vezes podem ser difíceis de observar em algumas articulações. Outros dos sinais característicos de DDA (Imagem 1) são a existência de osteófitos, a esclerose do osso subcondral e a calcificação dos tecidos intra ou peri-articulares (Bennett, 2010a; Denny & Butterworth, 2000; May, 1994). Os osteófitos localizam-se normalmente na periferia da articulação, podendo também estar localizados nos locais de união dos ligamentos e tendões. Podem ser detectados radiograficamente apenas 2-3 semanas após o início da DDA (Bennett, 2010a). A esclerose do osso subcondral é observada como um aumento da opacidade do osso,

sendo por isso um sinal radiográfico que tende a ser detectado apenas nos casos em que a doença já existe há algum tempo (Denny & Butterworth, 2000).

Imagem 1 - Imagens de Rx digital de joelhos de canídeo na projecção latero-lateral (Fonte: Serviço de Radiologia do Hospital da Faculdade de Medicina Veterinária).



A) Articulação classificada em Grau 0 (articulação sem alterações); B) Articulação classificada em Grau 4 para a presença de doença degenerativa articular. É possível verificar a presença de osteófitos, uma marcada diminuição do espaço articular, nítida esclerose subcondral e deformação óssea.

4.2.2. Tomografia Axial Computorizada

A Tomografia Axial Computorizada (TAC) proporciona uma imagem transversal seriada da área a pesquisar (Schulz, 2007), apresentando em relação à radiologia convencional a vantagem de permitir uma diferenciação da densidade tecidual superior e ausência de sobreposição de estruturas. Além disso na TAC é possível fazer reformatação das imagens em planos diferentes com reconstrução tridimensional de imagens, providenciando informações detalhadas das alterações ósseas decorrentes da DDA (Bennett, 2010a).

4.2.3. Ressonância Magnética

Este exame tem a capacidade de permitir obter uma imagem de elevada qualidade das estruturas intra-articulares que outras técnicas não permitem (Denny & Butterworth, 2000; Houlton, 1994). É um meio muito dispendioso e não está disponível a todos os clínicos.

4.2.4. Ultra-sonografia

Esta técnica, em avaliações ortopédicas é mais útil para a avaliação de estruturas de tecido mole como é o caso de tendões, ligamentos e meniscos (Schulz, 2007).

4.2.5. Artroscopia

A artroscopia consiste na examinação endoscópica da cavidade articular, sendo um método minimamente invasivo, permitindo visualizar directamente todas as estruturas internas da articulação como a superfície da cartilagem articular, os meniscos, ligamentos e a membrana sinovial (Houlton, 1994). O seu real benefício em cães com DDA ainda está para ser provado (Denny & Butterworth, 2000).

4.2.6. Artrocentese

A artrocentese consiste na punção da articulação sinovial e aspiração de líquido sinovial. A análise do líquido sinovial pode fornecer bastante informação sobre o processo em curso, sendo que nas articulações com DDA o volume de líquido sinovial pode estar normal ou aumentado, com aumento da viscosidade (Bennett, 2010a; Denny & Butterworth, 2000). Apresenta uma contagem de glóbulos brancos baixa (100-11000, média de 1500/mm³) (Bennett, 2010a), principalmente macrófagos e linfócitos.

5. O Fenómeno de Resposta da Fase Aguda

A resposta da fase aguda corresponde a uma reacção complexa, não específica que ocorre rapidamente após qualquer lesão no organismo, sendo considerada como fazendo parte do sistema imunitário inato do indivíduo. É caracterizada por um diversificado conjunto de efeitos sistémicos que incluem febre, leucocitose, aumento dos níveis de cortisol, diminuição da concentração de tiroxina e várias alterações metabólicas (Cerón, Eckersall & Martínez-Subiela, 2005). A esta resposta associam-se ainda alterações na concentração de proteínas plasmáticas, chamadas proteínas de fase aguda, onde algumas sofrem diminuição da concentração (sendo por isso designadas de proteínas de fase aguda negativas) como é o caso da albumina, e outras um aumento de concentração (sendo designadas de proteínas de fase aguda positivas), como a proteína C-reativa, a proteína sérica amilóide A, a haptoglobulina, alfa-1-glicoproteína ácida, ceroplasmina e do fibrinogénio (Cerón et al., 2005). Estas proteínas de fase aguda positivas são sintetizadas principalmente pelos hepatócitos quando estimulados por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e o TNF- α (Cerón et al., 2005; Clyne & Olshaker, 1999). Destas 3, no Homem a IL-6 é considerada a citocina principal, pois tem a capacidade de induzir sozinha a síntese de haptoglobulina, ou quando combinada com a IL-1 induzir a síntese da proteína C-reativa e da proteína sérica amilóide A.

5.1. A Proteína C-Reactiva (PCR)

A proteína C-reativa (PCR) foi detectada pela primeira vez em 1930 por William Tillet e Thomas Francis, no soro de doentes humanos com infecções agudas de pneumonia pneumocócica. Descobriram que no soro destes doentes existia uma substância que formava um precipitado quando combinada com a fracção C do *Streptococcus pneumoniae* (Tille & Frances, 1930), e que após a resolução da pneumonia, essa precipitação já não ocorria quando juntavam o soro de indivíduos recuperados com a fracção C. Mais tarde esta fracção C foi identificada como sendo um polissacarídeo da parede celular, mas foi em 1941 que O. Avery e Theodore Abernethy descobriram que essa substância reactiva responsável pela precipitação da fracção C era a PCR (Gotschlich, 1989), à qual teria sempre de se ligar o ião cálcio. Posteriormente descobriu-se que esta reacção não acontecia apenas na pneumonia pneumocócica, mas também numa variedade de outras infecções (Clyne & Olshaker, 1999; Mold, Gewurz & Du Clos, 1999). Em 1966 Diman e Coles demonstraram a existência da PCR no cão tendo sido isolada nesta espécie pela primeira vez em 1972 por Riley e Zontine (Riley & Zontine, 1972). A PCR foi identificada como fazendo parte da resposta precoce do organismo a estados inflamatórios, conduzindo à caracterização das chamadas proteínas de fase aguda, estando presente no organismo em quantidades basais e aumentando rapidamente de alguns microgramas por mililitro para várias centenas ou milhares (Mold et al., 1999) em resposta a uma lesão tecidual causada por uma grande variedade de doenças infecciosas e/ou inflamatórias (Clyne & Olshaker, 1999), queimaduras, necroses, traumas, parto, exercício intenso e até mesmo em doenças psiquiátricas (Ablij & Meinders, 2002). Utilizada por rotina em Medicina Humana como um marcador de estados inflamatórios e para monitorizar a evolução da doença e da terapêutica (Clyne & Olshaker, 1999; Eckersall & Conner, 1988; Pepys & Hirschfiel, 2003; Ohno et al., 2006; Yamamoto et al., 1993b).

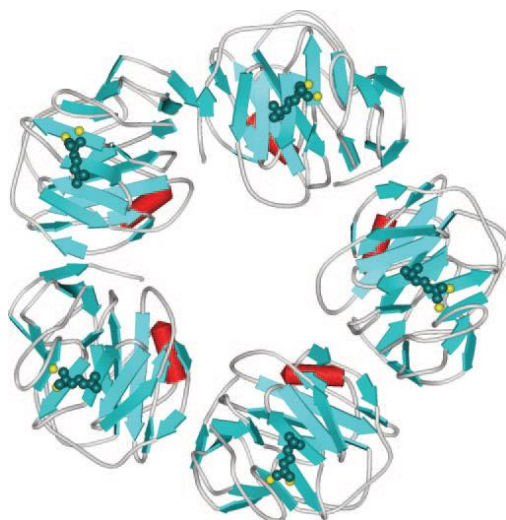
A PCR no cão é a proteína de fase aguda mais importante (Skinner, 2001) e a que suscita maior interesse como marcador de doença e condições de desequilíbrio (Eckersall, 2000), como leptospirose, babesiose, parvovirose (Cerón et al., 2005), leishmaniose (Martínez-Subiela, Tecles, Eckersall & Cerón, 2002), hepatite, prostatite aguda e peritonite (Riley & Zontine, 1972), trauma cirúrgico (Caspi et al., 1984; Yamamoto et al., 1993b), neoplasias, (nomeadamente linfoma, hemangiossarcoma e tumores mamários) (Caspi et al., 1984; Kjerlgaard-Hansen, Stadler & Jensen, 2008) piómetra, anemia hemolítica imunomediada, glomerulonefrite (Kjerlgaard-Hansen et al., 2008; Nakamura et al., 2008), lesões gastrointestinais, doença inflamatória intestinal (Cerón et al., 2005), artrite reumatóide e poliartrites não erosivas (Caspi et al., 1984). Contudo, em Medicina Veterinária os doseamentos de PCR não são ainda realizados por rotina, pelo que não existem estudos

aprofundados sobre sua concentração nas várias doenças (Nakamura et al., 2008). A principal vantagem da determinação da PCR prende-se com o facto das suas alterações serem muito precoces (Eckersall & Conner, 1988).

5.1.1. Estrutura Molecular da PCR

A PCR é uma proteína da família das pentraxinas, sendo constituída por cinco subunidades idênticas os protómeros (Figura 6), agregados numa forma pentamérica simétrica através de ligações não covalentes, entre as subunidades em redor de um poro central. A PCR canina tem um peso molecular de 100kDa, com cada uma das subunidades pesando aproximadamente 20kDa (Céron et al., 2005). Cada protómero é formado por 206 aminoácidos (Ablij & Meinders, 2002; Volanakis, 2001), organizados numa única cadeia peptídica que se encontra dobrada em duas folhas- β antiparalelas com uma α -hélice na face da proteína efectora (Volanakis, 2001).

Figura 5 - Diagrama do complexo PCR-fosfocolina (Black, Kushner & Samols, 2004).



Representação esquemática dos 5 protómeros que constituem a PCR. As esferas amarelas correspondem aos íões cálcio e as verdes à fosfocolina.

Cada protómero tem a capacidade para se ligar a dois íões cálcio, os quais são indispensáveis para as ligações específicas da PCR a determinados ligandos (Volanakis & Kaplan, 1971). O ligando com maior afinidade para estas ligações cálcio-dependentes é a fosfocolina, a qual é um constituinte dos fosfolípidos da membrana celular e das lipoproteínas do plasma. A fosfocolina está presente na maioria dos polissacarídeos das bactérias e fungos, mas também na maioria das membranas celulares (Ablij & Meinders, 2002; Volanakis & Kaplan, 1971), sendo que a ligação da PCR a esta molécula apenas é possível de se estabelecer quando existe lesão da membrana plasmática, que permita a sua exposição (Black, Kushner & Samols,

2004; Volanakis, 2001). A PCR também se pode ligar através destas ligações cálcio-dependentes a outros constituintes membranares e celulares de células necróticas, como é o caso das histonas, cromatina e pequenas células ribonucleoproteicas (Ablij & Meinders, 2002; Volanakis, 2001). Os dois íões de cálcio estão ligados à face côncava a denominada face B da PCR. O Primeiro íão cálcio interage com os resíduos Asp60, Asn61, Glu138, Asp140 e Gln139, enquanto que o segundo está ligado aos resíduos Glu138, Asp140, Gln 150 e Glu 147. Ambos os locais na cadeia têm afinidades idênticas para os íões cálcio. Por sua vez o local de ligação da fosfocolina ao protómero é constituído pelos dois íões de cálcio (daí ser uma ligação cálcio-dependente) e por uma porção adjacente hidrofóbica constituída pelos resíduos Phe66, Leu64, Thr76. A ligação é estabelecida através da interacção de dois oxigénios do grupo fosfato da fosfocolina, com os dois íões de cálcio e ainda pela interacção do grupo colina da fosfocolina com a porção hidrofóbica (Black et al., 2004; Thompson, Pepys & Wood, 1999; Volanakis, 2001). A outra face, designada de face A, apresenta uma α -hélice e um sulco bastante acentuado, onde ocorre a ligação da proteína C1q, necessária para a activação do sistema do complemento (Thompson et al., 1999; Volanakis, 2001) e é onde se pensa que também se liguem os receptores de Fc γ (Black et al., 2004). Assim a PCR apresenta duas faces: uma de reconhecimento (que é a que apresenta os cinco locais de ligação específicos para a fosfocolina), e outra face efectora (que apresenta os locais de ligação para a C1q) (Volanakis, 2001). Ao contrário da PCR humana que não é uma glicoproteína, duas das cinco sub-unidades que constituem a PCR canina são glicosiladas (Carpi et al., 1984), o que permite explicar em parte a dificuldade da utilização de anticorpos anti-PCR humana na medição de PCR canina (Cerón et al., 2005).

5.1.2. Biossíntese da PCR

A PCR é sintetizada principalmente pelos hepatócitos (Ablij & Meinders, 2002; Clyne & Olshaker, 1999; Volanakis, 2001) em resposta a infecções ou inflamações precoces, sendo codificada no Homem, por um gene que se encontra no cromossoma 1 entre 1q21 e 1q23, contendo 2263 nucleótidos e possui apenas um intrão (Woo, Korenberg & Whitehead, 1985). A indução da síntese PCR é regulada a nível transcripcional principalmente pela IL-6 (Black et al., 2004; Volanakis, 2001), mas também pela IL-1 e TNF- α (Clyne & Olshaker, 1999). As IL-6 e IL-1 regulam a expressão de muitos genes de proteínas de fase aguda através da activação do factor transcripcional STAT3, membros da família da C/EBP e de proteínas Rel. No caso da PCR os membros da família C/EBP, o C/EBP β e C/EBP δ são essenciais para a indução. Além dos locais de ligação de C/EBP, a região proximal do promotor do gene da PCR apresenta também locais de ligação para STAT3 e para proteínas Rel. (Black et al.,

2004). Após a transcrição o m-ARN da PCR é traduzido em protómeros, que depois no retículo endoplasmático rugoso são agregados em grupos de cinco, formando o pentâmero cíclico (Ablij & Meinders, 2002). Quando a PCR é libertada na circulação sofre uma distribuição uniforme no sangue sem que ocorra uma fixação significativa no tecido onde existe a inflamação (Hutchinson, Noble, Hawkins & Pepys, 1994). Após o aparecimento do estímulo agudo existe um aumento bastante significativo dos níveis desta proteína, que atinge o seu pico aproximadamente 48 h após o aparecimento da lesão (Ablij & Meinders, 2002; Volanakis, 2001), podendo persistir durante toda a permanência do estímulo. Existe assim uma forte correlação entre a duração e a intensidade do estímulo e o número de hepatócitos que se iniciam na síntese da PCR (Ablij & Meinders, 2002). A activação dos hepatócitos por parte das citocinas ocorre primeiro nos hepatócitos que estão na proximidade do espaço porta e posteriormente nos hepatócitos em direcção à veia centrolobular. A grande maioria da PCR é degradada também pelos hepatócitos, sendo apenas uma pequena parte (a que se encontra aderida a ligandos) degradada por neutrófilos e macrófagos (Ablij & Meinders, 2002). Após a resolução da inflamação os níveis séricos PCR descem, voltando rapidamente a valores normais, pois deixa de existir estímulo para a sua síntese e o seu tempo de semivida também é curto, varia segundo os autores entre 4-19h (Ablij & Meinders, 2002; Clyne & Olshaker, 1999).

5.2. As Funções Biológicas da PCR

A principal função biológica da PCR é determinada pela sua capacidade para reconhecer agentes patogénicos e células danificadas, mediando a sua eliminação através da activação do sistema de complemento e da modulação de células fagocíticas (Clyne & Olshaker, 1999; Molde et al., 1999; Volanakis, 2001). O sistema de complemento é constituído por aproximadamente 30 proteínas diferentes que desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos e na resposta inflamatória. A sua activação pode ser conseguida segundo 3 vias: a clássica, a alternativa e a via da lectina. As proteínas C1-C9 são os principais componentes da cascata de activação da via clássica, geralmente iniciada pela ligação de complexos imunológicos à C1q. A fase inicial gera posteriormente produtos de clivagem de C3 e C4, os quais actuam como opsoninas, facilitando a acção das células fagocíticas. A fase posterior da via clássica envolve a acção de C5-C9 (que são altamente inflamatórias) que geram potentes péptidos quimiotácicos que levam ao ataque de membranas celular, conduzindo a lise bacteriana ou das células às quais de ligam (Black et al., 2004). Quando se forma o complexo PCR-ligando, este complexo é reconhecido pela C1q, que corresponde a uma das 3 proteínas do complexo C1, e que induz a

formação de enzima C3 convertase (Ablj & Meinders, 2002; Black et al., 2004; Molde et al., 1999; Volanakis, 2001), que transforma a proteína C3 em C3a (activada) (a qual participa na desgranulação dos mastócitos) e em C3b. O complexo PCR-ligando-C3b, formado na superfície da célula-alvo, é então reconhecido pelos macrófagos ao nível do receptor membranário do C3b, sendo deste modo opsonizado e fagocitado (Black et al., 2004).

A activação do complemento por parte da PCR está limitada praticamente a C1-C4, que correspondem à fase inicial da via clássica, com pouca activação das proteínas C5-C9. Tal facto ocorre devido à inibição da formação da enzima C5 convertase pela ligação do factor H (cuja função é controlar a taxa de formação e a actividade das convertases do complemento) à proteína C3b (Molde et al., 1999). Como resultado desta inibição a resposta inflamatória tipicamente associada com C5a e o complexo de ataque à membrana provocado por C5-C9, são limitados (Black et al., 2004; Volanakis, 2001).

Outra propriedade importante, é a capacidade do complexo PCR-ligando em se ligar aos receptores de IgG Fc γ RI e Fc γ RII nas células fagocíticas (Ablj & Meinders, 2002; Black et al., 2004), provocando uma resposta de células fagocíticas, contribuindo mais ainda para a fagocitose dos microrganismos e células mortas (Gewurz, Zhang & Lint, 1995; Volanakis, 2001).

5.3. Factores que influenciam os valores da PCR no soro

Até à data não foram encontradas alterações na concentração sérica de PCR relacionadas com a idade, raça (Cerón et al., 2005; Yamamoto et al., 1994), sexo (Kuribayashi et al., 2003; Yamamoto et al., 1994) e ritmo circadiano (Otabe et al., 1998) de animais saudáveis. Contudo, os estudos demonstraram que durante a gestação existe um aumento dos valores de PCR principalmente no momento da implementação do embrião e o desenvolvimento da placenta, devido a uma reacção inflamatória induzida pela invasão endometrial do embrião (Cerón et al., 2005; Kuribayashi et al., 2003; Yamamoto et al., 1994). No que respeita aos factores ambientais, alguns estudos demonstraram que cães mantidos em ambientes controlados apresentam concentrações séricas de PCR mais baixas do que cães mantidos junto dos seus donos ($0,48 \pm 0,17$ mg/l) (Yamamoto et al., 1994) e ($8,4 \pm 4,6$ mg/l) (Yamamoto et al., 1993b), respectivamente. A explicação para tal pode ser devido ao facto de que os cães mantidos com os seus donos são expostos a mais factores ambientais que estimulam o sistema imunitário, o que não acontece nos indivíduos que estão num ambiente controlado. Estes mesmos factores ambientais podem explicar a variação intraindividual dos níveis séricos de PCR encontrados em animais saudáveis (Otabe et al., 1998).

5.4. Quantificação das concentrações da PCR

Actualmente a PCR em cães está a torna-se num dos parâmetros laboratoriais mais importantes na obtenção de informação de diagnóstico da presença de lesões inflamatórias, infecciosas, auto-imunes ou neoplásicas assim como também na avaliação da resposta às terapêuticas (Parra, Tecles, Martínez-Subiela & Céron, 2005). A sua determinação é realizada principalmente em soro, embora existam alguns estudos em que a mesma é avaliada em plasma, saliva (Parra et al., 2005), líquido cefalorraquidiano, urina (Cerón et al., 2005) e líquido sinovial (Bennett et al., 2013).

A sua medição utiliza principalmente os imunoensaios com anticorpos específicos contra a PCR, estando desenvolvidas e descritas várias técnicas, como a 1) imunodifusão radial (Conner, Eckersall, Ferguson & Douglas, 1988), 2) electroimunoensaio, 3) imunoturbidimetria (Eckersall, Conner & Harvie, 1991), 4) teste de ELISA (Yamamoto et al., 1993b) e 5) métodos de aglutinação passiva reversa em látex (RPLA) (Yamamoto et al., 1993b; Tagata et al., 1996). A IMUNODIFUSÃO é uma técnica na qual ocorre uma reacção de precipitação do complexo antigénio-anticorpo, num suporte de gel de agarose. Para a detecção da PCR é utilizada a imunodifusão radial, onde o soro do doente é colocado dentro de poços de agar que contêm os anticorpos monoclonais contra a PCR, e à medida que se vão formando os complexos antigénio-anticorpo, estes vão-se precipitando em torno do poço formando um halo. O diâmetro do halo de precipitação é directamente proporcional à quantidade de antigénio na amostra, pelo que quanto maior o diâmetro do halo maior a concentração de PCR (Conner et al., 1988). ELECTROIMUNOENSAIO é um método simples, rápido e reprodutível que envolve a comparação da amostra de concentração desconhecida, com uma série de diluições de uma concentração conhecida da proteína em estudo. Requer um anti-soro monoespecífico contra a proteína sob investigação. As amostras a serem comparadas são colocadas lado a lado em pequenos poços ao longo da margem de um gel de agarose que contém o anticorpo monoespecífico. De seguida as amostras são submetidas a electroforese em gel de agarose, onde a interacção entre o antigénio e o anticorpo ocorre. À medida que o antigénio começa a sair do poço e a entrar no gel, elas vão começar a interagir ligando-se às moléculas de anticorpo, começando a haver precipitação do complexo antigénio-anticorpo, a qual assume o aspecto de “rocket”, cuja altura é proporcional ao logaritmo da concentração da proteína em estudo (Walker, 1996). A IMUNOTURBIDIMETRIA baseia-se na adição de anticorpos anti-PCR ao soro do doente de forma a originar complexos antigénio-anticorpo. A turvação produzida, decorrente da precipitação dos complexos será proporcional à concentração da PCR presente no soro problema, o que permite a obtenção de uma curva padrão com as concentrações da PCR,

através da leitura com recurso a um espectrofotómetro. Permite a detecção da PCR a partir de concentrações tão baixa quanto 1 µg/ml (Eckersall et al., 1991). O método de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) para a detecção da PCR recorre ao método quantitativo “sandwich”, que apresenta como principal desvantagem a sua complexidade (Eckersall, Conner & Parton, 1989). Este teste baseia-se na utilização de uma microplaca de poliestireno, contendo poços previamente revestidos por anticorpos anti-PCR canina. No interior de cada poço em que é colocado o soro do doente, uma vez presente, o antigénio é capturado ligando-se ao anticorpo. Em seguida é feita uma primeira lavagem, para eliminação de antigénios livres, onde se adiciona um segundo anticorpo anti-PCR que se encontra acoplado a uma enzima e que se ligará ao primeiro imuno-complexo. Finalmente, após uma segunda lavagem é adicionado um substrato cromogénico que por acção da enzima, vai sofrer alterações na sua coloração. A reacção é interrompida pela adição de uma solução STOP, a quantificação é feita por leitura da densidade óptica num espectrofotómetro (450nm) (Yamamoto et al., 1993a). Por fim quanto ao MÉTODOS DE AGLUTINAÇÃO PASSIVA REVERSA EM LÁTEX (RPLA), é também um método quantitativo, de fácil utilização, rápido e que não necessita de equipamentos sofisticados (Tagata et al., 1996). Utiliza microesferas de látex (diâmetro de 0,12µm) revestidas por anticorpos anti-PCR canina, que são IgG de coelho anti-PCR canina. Após a adição do soro do doente, previamente diluído, as microesferas são colocadas no interior de um tubo capilar que posteriormente é centrifugado. A altura da coluna de látex precipitado no interior do tubo permite traçar uma curva de calibração e determinar a concentração da PCR (Tagata et al., 1996).

5.5. Factores pré-analíticos que influenciam os resultados

Os resultados obtidos para a quantificação da PCR podem ser influenciados/alterados por diferentes factores como é o caso de: 1) Condições de armazenamento da amostra, está descrito que a PCR canina se mantém estável a -10°C durante pelo menos 3 meses (Riley & Zontine, 1972), a -20°C durante 2 meses e que é inactivada quando exposta a 70°C durante 30 minutos (Dillman & Coles, 1966); 2) a preservação das amostras em diferentes anticoagulantes como a heparina, o *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) e o citrato apresentam valores de PCR significativamente mais baixos apenas nas amostras preservada em citrato (Martínez-Subiela, 2003).

III. Trabalho experimental

1. Objectivos

O presente estudo teve como objectivos; 1) quantificar a concentração da PCR no líquido sinovial em canídeos com doença degenerativa articular utilizando um teste de ELISA validado para quantificação da PCR no soro; 2) perceber se nestes doentes a PCR sérica está aumentada; 3) relacionar os níveis séricos da PCR com os valores obtidos no líquido sinovial; 4) relacionar os níveis séricos e sinoviais da PCR com o sexo dos indivíduos, presença de dor, condição corporal, exercício físico, alterações radiográficas presentes, articulação afectada, contagens de leucócitos e ainda com o início do aparecimento dos sinais e sintomas clínicos.

2. Material e métodos

2.1. Amostra

O estudo foi realizado numa amostra de 16 indivíduos (n=16) da espécie *Canis familiaris*, avaliados na consulta de Ortopedia/Traumatologia do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa e do Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis (CMVAA) no Barreiro durante o período de Março a Junho de 2013. Foi ainda considerado um controlo. Os critérios de inclusão do estudo foram: presença de claudicação ao exame objectivo, imagem radiográfica associada a DDA, ausência de doença concomitante e indivíduos com idade superior a 6 meses. O grupo controlo exigiu como critério de inclusão perfeito estágio hígido confirmado através do exame médico objectivo e da realização de hemogramas e bioquímicas sanguíneas (ureia, creatinina, glucose, ALT, AST, FAZ e ionograma). No Anexo 2 é feita a caracterização da população controlo.

Foi elaborada uma ficha de registo padronizada para todos os indivíduos no estudo (Anexo 3). O trabalho experimental considerou a colheita de forma asséptica e não dolorosa de amostras de sangue para obtenção de soro e líquido sinovial da articulação afectada (joelho 87,5%, cotovelo 6,25% e pulso 6,25%), nos indivíduos doentes e no joelho nos controlos. As amostras foram colhidas com consentimento informado dos proprietários. Todas as amostras foram centrifugadas a 1500 G durante 10 minutos e congeladas a -20 Graus Celcius (°C), num tempo máximo de 30 minutos após a sua colheita. Em cada indivíduo para obtenção de soro foi colhido para um tubo seco um volume máximo de 2 ml de sangue periférico, por punção na veia jugular, safena ou cefálica, que após centrifugação foi transferido o sobrenadante para um *ependorf*. Para a obtenção da amostra de líquido sinovial foi puncionado a cavidade articular com agulha de 23 Gauge e aspirado o líquido sinovial num volume mínimo de 0,5 ml que após centrifugação foi transferido o sobrenadante para um *ependorf*. As amostras foram congeladas a -20°C até à realização das análises.

Todos os indivíduos incluídos no estudo realizaram radiografias digitais à articulação afectada nos casos dos indivíduos doentes e joelho no caso dos indivíduos controlo em duas projecções (latero-lateral e crânio-caudal) para avaliação das alterações presentes. Cada imagem foi avaliada individualmente por dois médicos veterinários da área da radiologia, utilizando uma tabela (Anexo 4) para padronização da classificação da doença degenerativa articular presente. Ambas as classificações foram comparadas e ajustadas de forma consensual.

A determinação da concentração da PCR para cada amostra biológica foi conseguida utilizando um teste de ELISA validado para soro PhaseTM Range Canine C-Reactive Protein Assay (Anexo 5), comercializado pelo laboratório Tridelta Development Limited. A leitura da absorvência final das amostras foi realizada no espectrofotómetro (modelo N12648 Thermo Labsystems IEMS MF Type 1401) num comprimento de onda de 450nm. Todas as amostras foram realizadas em simultâneo e em duplicado, de acordo com as indicações do fabricante.

A análise estatística utilizou o recurso dos programas Microsoft Excel da Microsoft® Office Excel 2010 e R© version 3.0.1 para o Windows da R Development Core Team, 2013. Foi realizada a estatística descritiva (média, mediana, máximo e mínimo) para as variáveis quantitativas, idade, peso e valores da PCR obtidos (Anexo 6). Uma vez que com a realização do teste de Shapiro-Wilk o pressuposto de normalidade das variáveis não se observou na amostra, para a estatística inferencial de comparação entre grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon, o teste de Kruskal-Wallis e ainda o teste de correlação de Spearman. O estudo considerou um nível de significância de 95%, ou seja para valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

A amostra é constituída por 16 animais ($n=16$), 7 (42,7%) machos dos quais 2 (28,6%) castrados e 5 (71,4%) inteiros, e 9 (56,3%) fêmeas das quais 3 (33,3%) castradas e 6 (66,7%) inteiras. Com idades compreendidas entre os 6 meses e os 12 anos (média 4,5 anos) e um intervalo de peso vivo de 1,8 a 69,1kg. O grupo controlo é constituído por 4 animais, 1 macho (25%) e 3 fêmeas (75%), com idades compreendidas entre os 8 meses e 1,5 anos, com intervalo de peso vido de 3,2 a 12,5kg.

3.2. Concentração da PCR no soro e líquido sinovial

Os resultados obtidos através do teste de ELISA (Tabela 1 e Tabela 2) demonstraram no grupo controlo uma média da PCR sérica de $15,28 \pm 16,91$ mg/l (mínimo de 2,82 mg/l e máximo de 38,63 mg/l) e da PCR no líquido sinovial de $3,70 \pm 2,19$ mg/l (mínimo de 1,89 mg/l e máximo de 6,51 mg/l). No grupo de estudo a média da PCR sérica foi de $3,49 \pm 2,43$ mg/l (mínimo de 1,95 mg/l e máximo de 11,72 mg/l) e da PCR no líquido sinovial foi de $2,22 \pm 0,59$ mg/l (mínimo <1 mg/l e máximo de 3,55 mg/ml). Todos os resultados obtidos estão dentro dos valores de referência normais da PCR para o cão (0,8-30 mg/l) (Borer, Peel, Schawalder & Spreng, 2003; Hurter et al., 2005; Otabe et al., 1998; Yamamoto et al., 1993b; Yamamoto et al., 1994), à excepção de um dos animais controlo que apresenta os níveis séricos da PCR ligeiramente aumentados (controlo 2, Tabela 2). Para a PCR do líquido sinovial não existem valores de referência na literatura consultada, mas aquilo que se verificou foi que a média da PCR sinovial dos indivíduos controlo ($3,70 \pm 2,19$ mg/l) foi superior aos indivíduos em estudo ($2,22 \pm 0,59$ mg/l).

Tabela 1 - Resultado da concentração da PCR do grupo em estudo.

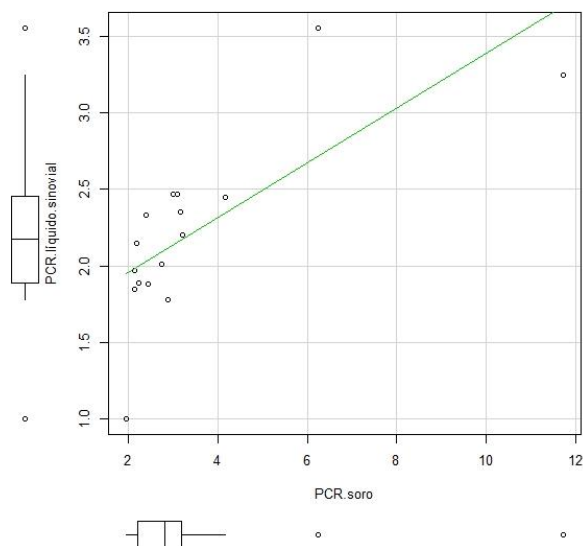
Caso	PCR-Líquido Sinovial (mg/l)	PCR- Soro (mg/l)
1	2,01	2,76
2	3,55	6,25
3	2,45	4,18
4	1,85	2,15
5	1,97	2,14
6	2,15	2,20
7	1,89	2,23
8	<1	1,95
9	2,20	3,21
10	2,35	3,17
11	1,88	2,44
12	3,25	11,72
13	2,33	2,40
14	2,47	3,00
15	2,47	3,09
16	1,78	2,90

Tabela 2 - Resultados da concentração da PCR do grupo controlo.

Controlo	PCR-Líquido Sinovial (mg/l)	PCR- Soro (mg/l)
1	1,89	2,82
2	2,05	38,63
3	4,36	16,86
4	6,51	2,82

Utilizando o teste de correlação de Spearman, verificou-se a existência de uma correlação forte com $R=0,78$ entre as concentrações da PCR no soro e no líquido sinovial dos indivíduos com DDA ($p < 0,001$) (Gráfico 1). No caso dos indivíduos do grupo controlo não se verificou nenhuma correlação estatisticamente significativa entre as concentrações de PCR no líquido sinovial e no soro.

Gráfico 1 - Variação da concentração da PCR no líquido sinovial em função da concentração da PCR nos indivíduos com DDA.



3.3. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial nos indivíduos com DDA e o género/sexo

Muito embora os valores médios obtidos no soro ($3,98 \pm 3,43$ mg/l) e no líquido sinovial ($2,32 \pm 0,48$ mg/l) dos indivíduos do sexo masculino sejam superiores aos obtidos nos indivíduos do sexo feminino ($3,11 \pm 1,37$ mg/l para o soro e $2,15 \pm 0,68$ mg/l para o líquido

sinovial) (Tabela 3), não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre género do indivíduo e a concentração da PCR sérica ($p=0,68$) e sinovial ($p=0,75$) (para $p<0,05$).

Tabela 3- Concentração da PCR em função do género, nos indivíduos com DDA.

Género	Estado	PCR-Líquido Sinovial	PCR-Soro
		Média (\pm desvio padrão) (mg/l)	Média (\pm desvio padrão) (mg/l)
Machos	Inteiros	2,32 \pm 0,58	4,53 \pm 4,03
	Castrados	2,31 \pm 0,60	2,60 \pm 0,57
		2,32 \pm 0,48	3,98 \pm 3,43
Fêmeas	Inteiras	2,17 \pm 0,84	3,13 \pm 1,12
	Castradas	2,11 \pm 0,29	3,06 \pm 1,01
		2,15 \pm 0,68	3,11 \pm 1,37

3.4. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial dos indivíduos com DDA e a presença de dor

O estudo permitiu verificar a presença de uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$) entre a concentração da PCR sérica em função da presença de dor (Gráfico 2). A concentração da PCR média foi superior nos indivíduos com dor (4,16 \pm 2,90 mg/l) relativamente àqueles que não apresentavam sinais álgicos (2,37 \pm 0,41 mg/l). No caso da PCR no líquido sinovial também foi possível verificar que as concentrações médias foram mais elevadas nos indivíduos que apresentavam dor (2,42 \pm 0,58 mg/l) relativamente aos que não a exibiam (1,91 \pm 0,49 mg/l) (Tabela 4). Contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa pois $p=0,18$, para um $p <0,05$.

Relativamente aos indivíduos que apresentavam dor, verificou-se que os que apresentavam um quadro álgico fácil de demonstrar revelaram um valor médio da PCR sérica de 5,21 \pm 1,46 mg/l superior aos indivíduos em que a dor não era fácil de evidenciar, com um valor de 3,90 \pm 3,18 mg/l. No entanto esta diferença não foi estatisticamente significativas pois $p=0,46$, para $p <0,05$.

Gráfico 2 - Variação da concentração da PCR no soro dos indivíduos com DDA em função da presença de dor.

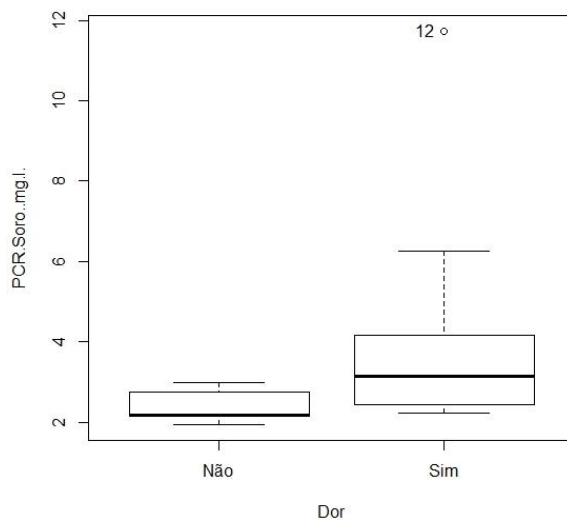


Tabela 4 - Concentração da PCR em função da presença de dor, nos indivíduos com DDA.

	PCR-Líquido Sinovial Média (\pm desvio padrão) (mg/l)	PCR-Soro Média (\pm desvio padrão) (mg/l)
Dor (62,5%)	2,42 \pm 0,58	4,16 \pm 2,90
Ausência de dor (37,5%)	1,91 \pm 0,49	2,37 \pm 0,41

3.5. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial dos indivíduos com DDA e os sinais radiográfica da DDA na articulação afectada

Foi possível classificar as alterações articulares presentes assim como estabelecer os seus graus, obtendo-se os seguintes resultados quanto às frequências relativas: grau 4 (12,5%), grau 3 (31,25%), grau 2 (31,25%), grau 1 (18,75%) e grau 0 (6,25%). Para cada grau considerado calcularam-se as seguintes médias da PCR sendo que para o grau 4 a média da PCR sérica foi de 4,20 \pm 2,90 mg/l e 2,70 \pm 1,21mg/l da PCR sinovial, no grau 3 a média de PCR sérica foi de 4,70 \pm 4,00 mg/l e 2,25 \pm 0,62 mg/l da PCR sinovial, no grau 2 a média da PCR sérica foi de 2,80 \pm 0,50 mg/l e 2,27 \pm 0,19 mg/l da PCR sinovial, no grau 1 a média da PCR sérica foi de 2,38 \pm 0,55 mg/l e 1,87 \pm 0,77 mg/l da PCR sinovial e no grau 0 em que apenas foi registado um caso, a concentração da PCR sérica obtida foi de 2,76 mg/l e a

sinovial foi de 2,01 mg/l (Tabela 5). Apesar dos graus mais elevados (3 e 4) apresentarem médias mais elevadas da PCR, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a concentração de PCR no soro ($p=0.68$) e líquido sinovial ($p=0.90$) relativamente à classificação radiográfica da articulação.

Tabela 5- Concentração da PCR em função da classificação radiográfica, nos indivíduos com DDA.

Classificação radiográfica da articulação	PCR-Líquido Sinovial Média (\pmdesvio padrão) (mg/l)	PCR-Soro Média (\pmdesvio padrão) (mg/l)
Grau 0 (12,5%)	2,01	2,76
Grau 1 (18,75%)	1,87 \pm 0,77	2,38 \pm 0,55
Grau 2 (31,25%)	2,27 \pm 0,19	2,80 \pm 0,50
Grau 3 (31,25%)	2,25 \pm 0,62	4,70 \pm 4,00
Grau 4 (12,5%)	2,70 \pm 1,21	4,20 \pm 2,90

3.6. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial dos indivíduos com DDA e a condição corporal e a actividade física.

Os indivíduos foram classificados através da observação da sua condição corporal, utilizando a classificação de Laflamme (1997) (Anexo7), em 2 grupos, os obesos e os com condição corporal normal. Os indivíduos obesos representam 37,5% da amostra e apresentam uma média da PCR no soro de 2,98 \pm 0,74 mg/l e no líquido sinovial de 2,14 \pm 0,26 mg/l. Os indivíduos com uma condição corporal normal representam 62,5% da amostra e apresentam uma média da PCR sérica de 3,79 \pm 3,05 mg/l e da sinovial 2,28 \pm 0,26 mg/l (Tabela 6). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a concentração da PCR no soro ($p=0.47$) e líquido sinovial ($p = 0.57$), relativamente à condição corporal.

Tabela 6- Concentração da PCR em função da condição corporal, nos indivíduos com DDA.

Condição Corporal	PCR-Líquido Sinovial Média (\pmdesvio padrão) (mg/l)	PCR-Soro Média (\pmdesvio padrão) (mg/l)
Normal (62,5%)	2,28 \pm 0,26	3,79 \pm 3,05
Obesos (37,5%)	2,14 \pm 0,26	2,98 \pm 0,74

Relativamente à actividade física os indivíduos foram classificados como activos, 56,3% da amostra exibindo uma média da PCR sérica de $3,87 \pm 3,22$ mg/l e de $2,26 \pm 0,77$ mg/l da PCR do líquido sinovial; os restantes 43,7% foram classificados como sedentários os quais apresentam uma concentração média da PCR sérica de $3,00 \pm 0,67$ mg/l e de PCR sinovial de $2,18 \pm 0,27$ mg/l. No entanto estas diferenças encontradas na concentração da PCR no soro ($p=0.50$) e no líquido sinovial ($p=0.98$) em relação à actividade física não são estatisticamente significativas.

Tabela 7 - Concentração da PCR em função da actividade física, nos indivíduos com DDA.

Actividade física	PCR-Líquido Sinovial	PCR-Soro
	Média (\pmdesvio padrão)	Média (\pmdesvio padrão)
	(mg/l)	(mg/l)
Activos (56,3%)	$2,26 \pm 0,77$	$3,87 \pm 3,22$
Sedentários (43,7%)	$2,18 \pm 0,27$	$3,00 \pm 0,67$

3.7. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial dos indivíduos com DDA com a articulação afectada

A articulação mais afectada na amostra estudada foi o joelho com uma frequência relativa de 87,5%, seguida de igual modo pelo cotovelo e articulação carpo-radial com um valor de 6,25%. A PCR sérica apresentou uma média de $3,38 \pm 2,43$ mg/l no joelho, de 6,25 mg/l no cotovelo e de 2,15 mg/l no pulso (no estudo apenas se registou 1 individuo com DDA em cada uma destas duas últimas articulações, razão pela qual os valores aqui apresentados corresponderem a valores absolutos). Para a PCR sinovial os resultados obtidos foram de $2,15 \pm 0,49$ mg/l no joelho, 3,55 mg/l no cotovelo e 1,85 mg/l no pulso (Tabela 8). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre estes valores de PCR e o tipo de articulação, quer na PCR sérica $p = 0.20$, quer na PCR sinovial $p = 0.14$, para $p < 0,05$.

Tabela 8 - Concentração da PCR em função da articulação afecta.

Articulação afectada	PCR-Soro	PCR-Líquido Sinovial
	Média (\pmdesvio padrão)	Média (\pmdesvio padrão)
	(mg/l)	(mg/l)
Joelho (87,5%)	$3,38 \pm 2,43$	$2,15 \pm 0,49$
Cotovelo (6,25%)	6,25	3,55
Pulso (6,25%)	2,15	1,85

3.8. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial de indivíduos com DDA e o início dos sinais clínicos

No estudo os doentes foram agrupados em 5 grupos, consoante a informação obtida com a história clínica relativamente ao início dos sinais clínicos. Os resultados obtidos foram os seguintes: para indivíduos com aparecimento dos sinais clínicos num período inferior a 1 semana, a média da PCR sérica foi de $3,04 \pm 0,20$ mg/l e de $2,01 \pm 0,40$ mg/l na PCR sinovial; entre 1 a 2 semanas a média da PCR sérica foi de $6,91 \pm 4,52$ mg/l e de $2,94 \pm 0,82$ mg/l na PCR sinovial; entre 2 a 3 semanas a média da PCR sérica foi de $2,33 \pm 0,16$ mg/l e de $2,06 \pm 0,24$ mg/l na PCR sinovial; entre 3 a 4 semanas a média da PCR sérica foi de $2,46 \pm 0,66$ mg/l e de $1,70 \pm 0,62$ mg/l na PCR sinovial e em indivíduos que apresentaram os sinais clínicos até há 8 semanas a média da PCR sérica foi de $2,61 \pm 0,50$ mg/l e de $2,24 \pm 0,30$ mg/l na PCR sinovial (Tabela 9). Não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa entre o início dos sinais clínicos e as concentrações médias da PCR no soro ($p=0,13$) e no líquido sinovial ($p=0,76$).

Tabela 9 - Concentração da PCR em função do início dos sinais clínicos.

Início dos sinais clínicos	PCR-Líquido Sinovial	PCR-Soro
	Média (\pmdesvio padrão)	Média (\pmdesvio padrão)
	(mg/l)	(mg/l)
< 1 semana (13,3%)	$2,07 \pm 0,40$	$3,04 \pm 0,20$
1 – 2 semanas (20%)	$2,94 \pm 0,82$	$6,91 \pm 4,52$
2 – 3 semanas (20%)	$2,06 \pm 0,24$	$2,33 \pm 0,16$
3 – 4 semanas (20%)	$1,70 \pm 0,62$	$2,46 \pm 0,66$
4 – 8 semanas (26,6%)	$2,24 \pm 0,30$	$2,61 \pm 0,50$

3.9. Relação da concentração da PCR no soro e no líquido sinovial de indivíduos com DDA e a contagem de leucócitos

Dos resultados obtidos foi possível verificar que 5 dos indivíduos com DDA apresentavam leucocitose (Tabela 10) e que em todos os indivíduos do grupo controlo as contagens de leucócitos estão dentro dos valores de referência (Tabela 11).

Tabela 10 - Contagem de leucócitos dos indivíduos com DDA.

Caso	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) (referência 6,0-17,0)
1	7,62
2	8,55
3	10,2
4	NA
5	NA
6	NA
7	NA
8	NA
9	NA
10	22,4
11	21,0
12	25,4
13	NA
14	17,0
15	23,7
16	23,8

Legenda: NA – indeterminado

Tabela 11 - Contagem de leucócitos dos indivíduos da amostra controle.

Controle	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) (referência 6,0-17,0)
1	11,0
2	12,8
3	8,0
4	16,3

Utilizando o teste de correlação de Spermán, não foi possível encontrar nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a concentração da PCR no soro ($R = -0.39$, e $p = 0,26$) e no líquido sinovial ($R = -0.35$, e $p = 0.33$), com a contagem de leucócitos nos indivíduos com DDA.

4. Discussão

No presente estudo foi possível detectar e quantificar a presença da PCR no líquido sinovial utilizando um teste de ELISA PhaseTM Range Canine C-Reactive Protein Assay, comercializado pelo laboratório Tridelta Development Limited validado para a detecção e quantificação da PCR sérica. O que está de acordo com a publicação efectuada durante a realização deste estudo de Bennett et al (2013). Considerando que o pilar do estudo assentou na utilização de um teste de ELISA de anticorpos anti-PCR canina para amostra biológica sérica, seria pois fácil de inferir que a negatividade do teste poderia estar associada a 3 condições: 1) ausência da PCR no líquido sinovial, 2) presença no líquido sinovial de algum constituinte molecular que impedisse a ligação do anticorpo anti-PCR às moléculas da PCR e/ou 3) que a sensibilidade, ou seja o limite inferior de detecção do teste fosse superior aos níveis da PCR presente no líquido sinovial.

Ao contrário da Medicina Humana em que os indivíduos com doença degenerativa articular (DDA) apresentam níveis séricos da PCR ligeiramente elevados comparativamente com indivíduos saudáveis (Pearle et al., 2007), neste estudo os níveis da PCR sérica dos indivíduos com DDA não variam em relação aos valores da PCR sérica em indivíduos saudáveis (0,8-30 mg/l), contudo o valor médio obtido com o estudo de $3,49 \pm 2,43$ mg/l é inferior comparativamente ao valor obtido num outro estudo realizado por Hurter et al (2005) numa amostra de 67 cães com DDA e onde a média da PCR sérica obtida foi de $9,3 \pm 1,2$ mg/l.

Considerando que não existem na literatura consultada valores de referência para a concentração da PCR no líquido sinovial foi neste estudo considerado um grupo controlo constituído por indivíduos saudáveis, sem doença de base aparente, baseado no exame médico objectivo e avaliação laboratorial de hemograma e bioquímicas sanguíneas (ureia, creatinina, glucose, ALT, AST, FAS e ionograma), de modo a quantificar os valores normais para a PCR sinovial. No entanto, o facto deste grupo ter um número reduzido de indivíduos (n=4) poderá ter influenciado os resultados obtidos. Na realidade, interessantemente verificou-se que as maiores concentrações da PCR foram obtidas em 2 indivíduos deste grupo controlo, sendo que em um deles a concentração da PCR sérica foi mesmo 28,8% superior ao valor de referência superior. É sabido que a PCR é uma proteína sensível e que se caracteriza por sofrer um aumento rápido em cerca de 4 horas (Caspi et al., 1984) após o aparecimento do estímulo, precedendo em muito o aumento da contagem dos leucócitos circulantes (Yamamoto et al., 1993b). No entanto é pouco específica (vários factores contribuem para o seu aumento) (Eckersall & Conner, 1988; Yamamoto et al., 1993b). Considerando todos estes factores este aumento pode ser justificado como sendo um valor fisiológico para este

indivíduo, já que o mesmo foi novamente avaliado ao final de 48 h, 8 dias e 16 dias após a colheita da amostra e continuava a apresentar um bom estado clínico.

Tal como no estudo de Bennett et al., (2013), também no presente estudo foi possível verificar que a concentração da PCR no líquido sinovial foi inferior à concentração da PCR no soro em todos os indivíduos, excepto num indivíduo do grupo controlo. O que está de acordo com o que se verifica em Medicina Humana, onde na grande maioria dos indivíduos com doenças articulares (degenerativas e outras) apresentam níveis da PCR no líquido sinovial inferiores aos níveis da PCR sérica (Catterall, Stabler, Flannery & Kraus, 2010; Rowe, Sheldon, Riches & Keat, 1987). Tal condição pode ser explicada pelo facto da PCR, principalmente sintetizada a nível hepático e depois lançada na corrente sanguínea ter alguma dificuldade em alcançar posteriormente o líquido sinovial devido ao seu peso molecular. Muitas das proteínas presentes no plasma e que apresentam uma concentra reduzida no líquido sinovial têm em comum o seu elevado peso molecular (Kushner & Somerville, 1971). Assim a correlação verificada entre a concentração da PCR sérica e a PCR sinovial pode estar associada à dificuldade na sua passagem para o interior da articulação, não sendo contudo possível excluir a possibilidade de existir degradação intra-articular desta. De acordo com o considerado, é assim possível pensar que quanto aos valores da PCR no indivíduo 4 do grupo controlo (apresenta maior concentração da PCR no líquido sinovial relativamente ao soro) eles podem resultar de uma troca na identificação das amostras.

Embora os valores obtidos da PCR no soro e no líquido sinovial dos indivíduos do sexo masculino sejam superiores aos dos indivíduos do sexo feminino, não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre eles, de lembrar que de acordo com a literatura consultada não existe relação entre as concentrações da PCR e o género dos indivíduos (Kuribayashi et al., 2003; Yamamoto et al., 1994).

A dor é um dos 5 sinais cardinais da inflamação. As citocinas pró-inflamatórias além de contribuírem para o início e manutenção do processo inflamatório, exercem também uma influência considerável sobre os nociceptores, estimulando-os directamente e aumentando a sua sensibilidade (Mich & Hellyer, 2010), resultando numa sensibilização periférica que conduz a uma situação de hiperalgesia na qual existe uma resposta aumentada aos estímulos dolorosos, explicando assim a existência de dor na condição de DDA. Como referido, na DDA verifica-se um aumento das citocinas pro-inflamatórias, sendo as mais expressivas a IL-1, IL-6 e o TNF- α que podem estimular directamente ou indirectamente (através da libertação de prostaglandinas) os nociceptores (Mich & Hellyer, 2010). É assim de esperar que a indivíduos com níveis mais elevados da PCR sérica correspondam também indivíduos com maiores estádios de dor. O que está de acordo com o presente estudo, em que os indivíduos que

apresentaram dor articular são também os que apresentaram maiores concentrações da PCR sérica e sinovial. Ainda em relação à dor, o estudo considerou a facilidade com que os indivíduos manifestavam a condição álgica, verificando-se que nos indivíduos que apresentavam dor mais fácil de elicitar a média da concentração da PCR sérica ($5,21 \pm 1,46$ mg/l) foi superior à encontrada nos indivíduos em que a dor não era fácil de elicitar ($3,46 \pm 3,25$ mg/l); o que está de acordo com o facto de a uma condição de dor esteja associada um maior processo inflamatório, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa. Relativamente à relação entre as alterações radiográficas e as concentrações sérica e sinovial da PCR verificou-se com o estudo que os indivíduos com imagens articulares classificadas radiograficamente com um maior grau de DDA (nomeadamente os graus 3 e 4) apresentaram maiores concentrações da PCR sérica e sinovial, comparativamente aos indivíduos com menores graus de DDA, muito embora os resultados não sejam estatisticamente significativos (para isso contribuiu o facto de o número de indivíduos classificado em cada grau ser reduzido), eles correspondem ao esperado, já que a graus mais elevados de DDA estão associados processos inflamatórios de carácter crónico e mais intensos, com níveis esperados da PCR mais elevados. De acordo com a classificação da DDA considerada no estudo, a níveis mais elevados de DDA corresponde uma maior perda de cartilagem articular e maior lesão de osso subcondral, associando-se tal facto à produção de maiores quantidades de IL-1, IL-6 e TNF- α , responsáveis pela estimulação da produção da PCR. O facto da lesão atingir o osso subcondral, também pode contribuir para o aumento da resposta inflamatória presente no local (Schulz, 2008), já que a cartilagem articular é avascular, condição que limita a resposta inflamatória, sendo que todas as células inflamatórias passam do plasma sanguíneo para o líquido sinovial ao nível da membrana sinovial e posteriormente desta por difusão para a cartilagem articular. Quando a lesão atinge o osso subcondral, como este é vascularizado existe uma maior contribuição para um processo inflamatório mais intenso.

Interessa referir o caso particular do indivíduo do grupo estudo, ao qual foi diagnosticado luxação medial de patela grau III, sem apresentar qualquer alteração na articulação a nível radiográfico, sendo por isso classificado com o Grau 0. A sua inclusão no estudo, justifica-se pela tentativa de avaliar as concentrações da PCR no soro e no líquido sinovial, num indivíduo que ainda não apresentava alterações radiográficas, permitindo a sua comparação com os restantes. De acordo com os resultados obtidos, o indivíduo em causa apresenta valores da PCR no soro e no líquido sinovial bastante próximos aos indivíduos classificados com grau 1 e 2 de DDA.

Uma das recomendações no maneiio terapêutico do doente com DDA é o controlo do seu peso corporal (Bennett, 2010a), de forma a diminuir a carga suportada pela(s) articulação(ões)

afectada(s) e conseqüentemente diminuir assim os sinais clínicos exibidos. De igual modo, é de supor que em indivíduos com excesso de peso as suas articulações estejam sujeitas a maiores cargas o que contribui para o desenvolvimento de DDA através da lesão mecânica da cartilagem articular, de recordar que a maioria dos indivíduos que apresentam lesão articular, nomeadamente DDA apresentam peso acima do normal (Piermattei et al., 2006) Com o estudo observou-se que os indivíduos classificados com condição corporal normal apresentaram maiores concentrações médias da PCR sérica e sinovial, do que os indivíduos obesos. A actividade física é um outro factor importante na contribuição do aparecimento e evolução da DDA. O tipo e a quantidade de exercício, especialmente desenvolvido em pisos duros contribui em muito para a sobrecarga das articulações e conseqüente lesão articular e de igual modo para a limitação ou imobilidade da articulação afectada (Bullough, 2007). Nos indivíduos com DDA, o exercício é mesmo peça fundamental para a sua evolução, pois além de permitir um controlo do peso do indivíduo, proporciona a manutenção da tonicidade muscular, impedindo assim a flacidez, a qual contribui para o início de um ciclo vicioso em que o indivíduo por não ter força muscular não se movimenta, aumentando de peso, induzindo uma sobrecarga articular que por sua vez associada ao aparecimento de outros sinais clínicos, entre eles a dor, os quais provocam um desincentivo da actividade física, aumentando ainda mais a perda de massa muscular e assim por diante. Os indivíduos do estudo foram classificados em activos ou sedentários de acordo com a opinião dos donos para a actividade e física de cada um. Os resultados obtidos não permitiram encontrar diferenças estatisticamente significativas entre a concentração da PCR no soro e no líquido sinovial relativamente à actividade física dos indivíduos.

É sabido que existe uma correlação, embora relativamente fraca entre os níveis da PCR sérica e o número de leucócitos (Cerón et al., 2005; Filiz, Kriz, Merin & Kriz, 2009 Ohno et al., 2006). Indivíduos com aumentos no número de leucócitos apresentam níveis significativamente também elevados da PCR sérica, no entanto no presente estudo não se observou uma relação estatisticamente significativa.

Neste estudo foi possível verificar que 5 indivíduos doentes exibiam leucocitose, sem contudo se verificar um aumento dos níveis da PCR sérica. Tal facto pode ser explicado, estando associado ao tempo de semi-vida reduzido que a PCR apresenta, diminuindo mais rapidamente a sua contagem do que os leucócitos circulantes periféricos (Yamamoto et al., 1993b). Tal condição vem apoiar a questão de que a DDA é uma doença articular não inflamatória, ou melhor, onde a expressividade inflamatória ocorre apenas localmente sendo pois limitada no espaço, e sem repercussões sistémicas. Podendo a leucocitose reflectir outras lesões ou inflamações anterior a esta lesão já debeladas. Seria talvez interessante, nos casos

onde se registaram as leucocitoses que se realizasse a contagem de leucócitos no líquido sinovial da articulação afectada, para melhor compreender uma possível relação entre leucócitos periféricos e intra-articulares. É um factor importante a considerar que, todos os doentes que integraram o presente estudo, foram referenciados para a consulta de Ortopedia e Traumatologia com períodos de evolução da condição clínica variáveis, assim como com uma história clínica de utilização de terapêutica prévia diferenciada, na sua grande maioria anti-inflamatórios não esteróides (AINES). Embora seja conhecido que os AINES não bloqueiam directamente a produção de IL-6 e que por isso, podem não influenciar relevantemente a variação da concentração da PCR (Borer et al., 2003) alguns dos doentes estiveram sujeitos a politerapia, nem sempre conseguida identificar na sua totalidade.

O facto de não se ter registado diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações da PCR sérica e sinovial e o início dos sinais clínicos, poderá estar também relacionado com o tipo de vigilância ou percepção por parte dos proprietários dos indivíduos e a capacidade ou facilidade em reconhecerem a condição clínica alterada do seu animal. É conhecido que após a eliminação do estímulo doloroso, os níveis da PCR voltam aos valores normais em 1-2 semanas (Ablj & Meinders, 2002; Clyne & Olshaker, 1999). Neste estudo apenas num doente as amostra biológicas foram colhidas relativamente próximo ao início dos sinais clínicos (às 72 h).

Com a realização deste estudo foi possível concluir: 1) o presente estudo, tal como o estudo de Bennett et al., (2013) permitiu quantificar a concentração da PCR no líquido sinovial utilizando um teste de ELISA previamente validado e utilizado comercialmente para determinação da PCR sérica (PhaseTM Range Canine C-Reactive Protein Assay, do laboratório Tridelta Development Limited), 2) existe uma correlação entre os níveis da PCR no soro e os níveis da PCR no líquido sinovial, apresentando as menores concentrações neste último, 3) indivíduos com DDA apresentam concentrações séricas de PCR dentro dos valores de referência, 4) indivíduos com maior grau de dor apresentam maiores concentrações da PCR sérica.

Este é um estudo preliminar para estudar melhor as variações e relações da PCR sérica e sinovial em indivíduos com DDA havendo necessidade de dar continuidade ao mesmo, alargando o tamanho da amostra de modo a entender melhor algumas relações que ficaram em registo e para as quais não foi possível estabelecer relações estatisticamente significativas. É o caso de: 1) indivíduos com dor fácil de elicitam apresentam concentrações da PCR sérica e sinovial mais elevadas, 2) alterações radiográficas mais exuberantes classificadas com

maiores graus (3 e 4) correspondem concentrações mais elevadas da PCR sérica e sinovial, 3) avaliação da concentração da PCR sérica e sinovial de acordo com o início dos sinais clínicos.

IV. Bibliografia

- Abercromby, R. (1994). Infective arthritis. In R. W. Collinson (Ed.), *Manual of small animal arthology*. (pp.100-114). Bournemouth, England: BSAVA.
- Ablj, H.C. & Meinders, A.E. (2002). C-reactive protein: history and revival. *European Journal of Internal Medicine*, 13, 412-422.
- Barland, P., Novikoff, E.R. & Hamerman, D. (1962). Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol*, 14, 207-220.
- Bélanger, L.F. (1977). The skeletal tissues. In L. Weiss & R.O. Greep (Eds.), *Histology*. (4th ed.). (pp.205-249). USA: McGraw-Hill.
- Bennett, D. (2010a). Canine and feline osteoarthritis. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine*. Volume 1 (7th ed.). (pp.750-761). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Bennett, D. (2010b). Immune-mediated and infective arthritis. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine*. Volume 1 (7th ed.). (pp.743-749). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Bennett, D., Eckersall, P.D., Waterston, M., Marchetti, V., Rota, A., McCulloch, E. & Sbrana, S. (2013). The effect of robenocoxib on the concentration of C-reactive protein in synovial fluid from dogs with osteoarthritis. *BMC Veterinary Research*. 9(42).
- Black, S., Kushner, I. & Samols, D. (2004). C-reactive protein. *Journal of Biological Chemistry*, 179(47), 48487-48490,
- Borer, L.R., Peel, J.E., Schawalter, P. & Spreng, D.E. (2003). Effect of carprofen, etodolac, meloxicam, or butorphanol in dogs with induced acute synovitis. *Am J Vet Res*. 64, 1429-1437.
- Brunnberg, L., 1987. Klinische und experimentelle Untersuchungen zu Ätiologie, Pathogenese und Therapie der Ruptur des Ligamentum cruciatum craniale im Kniegelenk des Hundes. Thesis. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Buckwalter, J.A., Mankin, H.J. & Grodzinsky, A.J. (2005). Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect*, 54, 465-480.
- Bullough, P.G. (2007). Joints. In S.E. Milles (Ed.), *Histology for pathologists*. (3rd ed.). (pp. 97-121). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Carneiro, J. & Junqueira, L.C. (2004). *Histologia basica*. (10^a edição). (pp.150-153). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Caspi, D., Baltz, M.L., Snel, F., Gruys, E., Niv, D., Batt, R.M., Munn, E.A., Buttress, N. & Pepys, M.B. (1984). Isolation and characterization of C-reactive protein from dog. *Immunology*, 53, 307-313.

- Catterall, J.B., Stabler, T.V., Flannery, C.R. & Kraus, V.B. (2010). Changes in serum and synovial biomarkers after acute injury. *Arthritis Research & Therapy*, 12, R229
- Cerón, J.J., Eckersall, P.D. & Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 34(2), 85-99.
- Clements, D.N., Owen, M.R., Mosley, J.R., Carmichael, S., Taylor, D.J. & Bennett, D. (2005): Retrospective study of bacterial infective arthritis in 31 dogs. *J Small Anim Pract*, 46, 171-176.
- Clyne, B. & Olshaker, J.S. (1999). The C-reactive protein. *The Journal of Emergency Medicine*, 17(6), 1019-1025.
- Conner, J.G., Eckersall, P.D., Ferguson, J. & Douglas, T.A., 1988. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in Veterinary Science*, 45, 107-110.
- Denny, H.R. & Butterworth, S.J. (2000). A Guide to canine and feline orthopaedic surgery (4th ed.). Oxford, UK: Blackwell Science.
- Dillman, C.R. & Coles, E.H. (1966). A canine serum fraction analogous to human C-reactive protein. *Am J Vet Res*, 27, 1769-1775.
- Eckersall, P.D. (2000). Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151, 577-584.
- Eckersall, P.D. & Conner, J.G. (1988). Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research Communication*, 12, 169-178.
- Eckersall, P.D., Conner, J.G. & Harvie, J. (1991). An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Research Communications*, 15, 17-24.
- Eckersall, P. D., Conner, J. G. & Parton, H. (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein. *The Veterinary Record*, 124(18), 490-491.
- Espanha, M.M. (2010), Cartilagem Articular: Estrutura e composição Histoquímica. *Acta Reumatol Port*, 35, 424-433.
- Eurell, J.A.C. & Van Sickle, D.C. (1998). Connective and supportive tissues. In H.D. Dellmann & J. Eurell (Eds.), *Veterinary histology*. (5th ed.). (pp.32-61). Baltimore, Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Eyre, D.R., Wu, J.J. & Woods. P. (1992). Cartilage-specific colagens: structural studies. In K.E. Kuettner, R. Schleyerbach, J.G Peryon & V.C. Haskell (Eds.), *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. (pp119-132). New York: Raven Press.
- Feldmann, M. Brennan, F.M. & Maini, R.N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 397-440.

- Filiz, I., Kriz, K., Merin, H. & Kriz, D. (2009). Magnetic permeability based diagnostic test for the determination of the canine C-reactive protein concentration in undiluted whole blood. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 1632-1634.
- Gartner, L.E. & Hiatt, J.L. (2001). *Color Textbook of Histology*. (2nd ed.). (pp.71-84) Philadelphia: Saunders Company.
- Garvian, E.R., Vaughan-Thomas, A., Innes, J.F. & Clegg, P.D. (2010b). Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of collagen degradation and synthesis. *The Veterinary Journal*, 185, 36-42.
- Getty, R. (1986). Sindesmologia. In R. Getty (ed.), *Sisson/Grossman Anatomia dos animais domésticos Volume 1* (5^a edição). (pp.33-37). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Gewurz, H., Zhang, X.H. & Lint, T.F. (1995). Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol*, 69(3), 1747-1754.
- Goldberg, B. & Rabinovitch, M. (1977). Connective tissue. In L. Weiss & R.O. Greep (Eds.), *Histology*. (4th ed.). (pp.145-178). USA: McGraw-Hill.
- Goldring, M.B. (2000). Osteoarthritis and cartilage: The role of cytokines. *Current Rheumatology Reports*, 2, 459-465.
- Goldring, M.B. (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskel*, 4, 269-285.
- Goldstein, R.E. (2010). Swollen joints and lameness. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine*. Volume 1 (7th ed.). (pp.130-133). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Gotschlich, E.C. (1989). C-reactive protein. A historical overview. *Ann NY Acad Sci*, 557, 9-18.
- Laflamme, D.P. (1997). Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Practice July/August*, 22, 10-15.
- Hay, C.W. & Manley, P.A. (2006). Immune-mediated arthritis. In S.J. Birchard & R.G. Sherding (Eds.), *Saunders manual of small animal practice*. (3rd ed.). (pp. 1227-1232). Philadelphia, USA: Saunders.
- Houlton, J. (1994). A problem orientated approach to the diagnosis of joint disease. In R. W. Collinson (Ed.), *Manual of small animal arthology*. (pp.8-21) Bournemouth, England: BSAVA.
- Hurter, K., Sreng, D., Rytz, U., Schawalder, P., Ott-Knusel, F. & Schmokel, H. (2005) Measurement of C-reactive protein in serum and lactate dehydrogenase in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, 169, 281-285.
- Hutchinson, W.L., Noble, E.G., Hawkins, P.N. & Pepys, M.B. (1994). The pentraxins, C-reactive protein and serum amyloid P component, are cleared and catabolized by hepatocytes in vivo. *J Clin Invest*, 94, 1390-1396.

- Jaffee, H.L.(1972). Structure of joint, bursal mucosae, tendon sheaths. In *Metabolic degenerative and inflammatory diseases of bones and joints*. (pp. 80-104) Philadelphia: Lea & Febiger.
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.P. & Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 7, 33-42.
- Kjerlgaard-Hansen, M., Stadler, M. & Jensen, A.L. (2008). Canine serum C-reactive protein detected by means of a near-patient test for human C-reactive protein. *Journal of Small Anima Practice*, 49, 282-286.
- Kuribayashi, T., Shimada, T., Matsumoto, M., Kawato, K., Honjyo, T., Fukuyama, M., Yamamoto, Y. & Yamamoto, S. (2003). Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Experimental Animals*, 52 (5), 387-390.
- Kushner, I. & Somerville, J.A. (1971). Permeability of human synovial membrane to plasma proteins. Relationship to molecular size and inflammation. *Arthritis Rheum.* 14, 560-570.
- Mankin, H.J. (1974). The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. *N Engl J Med*, 291, 1285-1292.
- Maroudas, A., Bullough, P., Swanson, S.A. & Freeman, M.A.R. (1968). The permeability of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*, 50, 166-177.
- Martínez-Subiela, S. (2003). *Acute Phase Proteins in the Dog: Analytical and Clinical Validation Studies*. Ph.D. Thesis. University of Murcia, Murcia, Spain.
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Eckersall, P.D. & Cerón, J.J. (2002). Serum concentration of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis, *Veterinary Record*, 150, 241-244.
- Matta, C. & Zakany, R. (2013). Calcium signalling in chondrogenesis: implications for cartilage repair. *Frontiers in Bioscience*, 5, 305-324.
- May, S.A. (1994). Degenerative Joint Disease. In R. W. Collinson (Ed.), *Manual of small animal arthology*. (pp.62-74). Bournemouth, England: BSAVA.
- May, S.A. & Bennet, D. (1994). Immune mediated arthritides. In R. W. Collinson (Ed.), *manual of small animal arthology*. (pp.86-99). Bournemouth, England: BSAVA.
- Mich, M.P. & Hellyer, P.W. (2010). Clinical pain identification, assessment, and management, In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine*. Volume 1 (7th ed.). (pp.48-63). St. Louis, Missouri: Sauders Elsevier
- Mold, C., Gewurz, H. & Du Clos, T.W. (1999). Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*, 42, 23-30.
- Mort, J.S. & Billington, C.J. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis: Matrix degradation. *Arthritis Res*, 3, 337-341.

- Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K., Koshino, A., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y. & Tsujimoto, H. (2008). C-reactive protein concentration in dog with various diseases. *J Vet Med Sci*, 70(2), 127-131.
- Olsson, S. & Ekman, S. (2002). Morphology and physiology of the growth cartilage under normal and pathologic conditions. In G.E. Fackelmen (Ed.), *Bone in Clinical Orthopedics*. (2nd ed.). (117-155). Germany: Thieme.
- Ohno, K., Yokoyama, Y., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y. & Tsujimoto, H. (2006). C-reactive protein concentration in canine idiopathic polyarthritis. *J Vet Med Sci*, 68(12), 1275-1279.
- Onyekwelu, I. Goldring, M.B. & Hidaka, C. (2009). Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration. *Jornal of Cellular Biochemistry*, 107, 383-392.
- Otabe, K., Sugimoto, T., Jinbo, T., Honda, M., Kitao, S., Hayashi, S., Shimizu, M. & Yamamoto, S. (1998). Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. *Veterinary Research Communications*, 22, 77-85.
- Palmoski, M.J. & Brandt, K.D. (1984). Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plug in vitro. *Arthritis Rheum*. 27, 675-681.
- Palmoski, M., Perricone, E. & Brandt, K.D. (1979). Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. *Arthritis Rheum*. 22, 508-517.
- Parra, M.D., Tecles, F., Martínez-Subiela, S. & Céron, J.J. (2005). C-reactive protein measurement in canine saliva. *J Vet Diagn Invest*, 17, 139-144.
- Pearle, A.D., Warren, R.F. & Rodeo, S.A. (2005). Basic science of articular cartilage and osteoarthritis, *Clin Sports Med*, 24, 1-12.
- Pearle, A.D., Scanzello, C.R., George, S., Mandle, L.A., DiCarlo, E.F., Peterson, M., Sculco, T.P. & Crow, M.D. (2007). Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15, 516-523.
- Pedersen, N.C. (1978). Canine joint disease. In *Scientific Proceeding of 45th Annual Meeting of the American Animal Hospital Assiciation*. (pp.359-366). South Bend, Indiana.
- Pepys, M.B. & Hirschfiel, M.G. (2003). C-reactive protein: A critical up-date. *J Clin Invest*, 111, 1805-1812.
- Piermattei, D.L., Flo, G.L. & DeCamp, C.E. (2006). *Brinker, Piermattei, and Flo' Handbook of small animal orthopedics and fracture repair*. (4th ed.). USA: Sauders Elsevier.
- Plickert, H.D., Bondzio, A., Einspanier, B., Tichy, A. & Brunnberg, L. (2013). Hyaluronic acid concentrations in synovial fluid of dogs with different stages of osteoarthritis. *Research in Veterinary Science*, 94,728–734.
- Poole, A.R., Kobayashi, M., Yasuda, T., Lavery, S., Mwale, F., Kojima, T., Sakai, T., Wahl, C., El-Maadawy, S., Webb, G., Tchetina, E. & Wu, W. (2002). Type II collagen

- degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 61, 78-81.
- Riley, R.F. & Zontine, W. (1972). Further observations on the properties of dog C-reactive protein and the C-reactive protein response in the dog. *J Lab Clin Med*, 80, 698-703.
- Ross, M.H. & Pawlina, W. (2006). *Histology - A text and atlas with correlated cell and molecular biology.* (5th ed.). Baltimore, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rowe, F.I., Sheldon, J., Riches, P.G. & Keat, A.C.S. (1987). Comparative studies of serum and synovial fluid C reactive protein concentrations. *Annals of Rheumatic Diseases*, 46, 721-726.
- Sandell, L.J. & Aigner, T. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*, 3, 107-113.
- Schulz, K. (2007). Afecções articulares. In T.W. Fossum (Ed.), *Cirurgia de pequenos animais.* (3^a ed.). (pp.1143-1315). Rio de Janeiro: Mosby Elsevier.
- Schulz, R.M. & Bader, A. (2007). Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J* , 36, 539-568.
- Skinner, J.G. (2001). Special report. International standardization of acute phase proteins. *Veterinary Clinical Pathology*, 30, 2-7.
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R. & Mobasher, A. (2009). The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, 179, 10-24.
- Tagata, K., Yokoyama, S., Ginbo, T., Honda, M., Okimura, T., Odakura, M., Nomura, M. & Yamamoto, S. (1996). Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog. *Veterinary Research Communications*, 20(1), 21-30.
- Thompson, D., Pepys, M.B. & Wood, S.P. (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*, 7, 169-177.
- Tillet, W.S. & Francis, T. (1930). Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*, 52, 561-571.
- Tiu, S.K., Suter, P.E., Fischer, C.A. & Dorfman, H.D. (1969). Rheumatoid arthritis in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 154, 495-502.
- van der Krann, P.M. & van den Berg, W.B. (2008). Osteoarthritis in the context of aging and evolution. Loss of chondrocytes differentiation block during ageing. *Ageing Research Reviews*, 7, 106-113.
- Volanakis, J.E. (2001). Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Molecular Immunology.* 38, 189-197.

- Volanakis, J.E. & Kaplan, M.H. (1971). Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Bio Med.* 136, 612-614.
- Walker, J.M. (1996). Rocket immunoelectrophoresis. In J.M. Walker (ed.). *Proteins protocols handbook.* (pp757-762) Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Woo, P., Korenberg, J.R. & Whitehead, A.S. (1985). Characterization of genomic and complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison with the complementary DNA sequence of serum amyloid P component. *J Biol Chem*, 260, 13384-13388.
- Yamamoto, S., Miyaji, S., Abe, N., Otabe, K., Furukawa, E. & Naiki, M. (1993a). Canine C-reactive protein (CRP) does not share common antigenicity with human CRP. *Veterinary Research Communications*, 17, 259-266.
- Yamamoto, S., Shida, T., Miyaji, S., Santsuka, H., Fujise, H., Mukawa, K., Furukawa, E., Nagae, T. & Naiki, M. (1993b). Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Veterinary Research Communications*, 17, 85-93.
- Yamamoto, S., Shida, T., Okimura, T., Otabe, K., Honda, M., Ashida, Y., Furukawa, E., Sarikaputi, M. & Naiki, M. (1994). Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test. *Veterinary Research Communications*, 16, 74-77.

V. Anexos

Anexo 1- Estatística descritiva da casuística avaliada durante o estágio curricular realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, no período relativo a Setembro de 2012 até Fevereiro de 2013.

Gráfico 3 - Frequência relativa (%) das diferentes espécies animais na área da Medicina Interna.

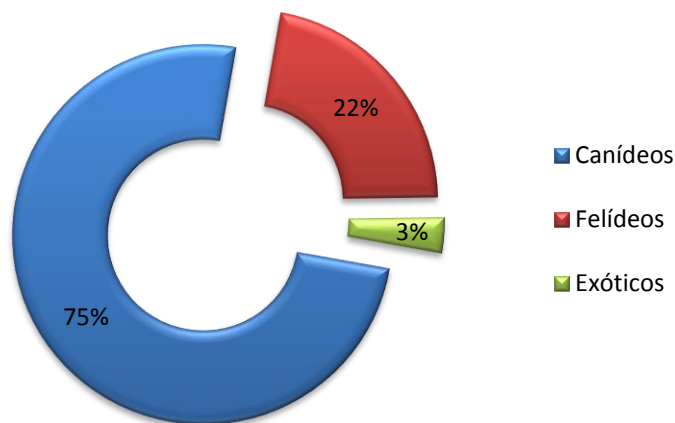


Gráfico 4 - Frequência relativa (%) dos casos clínicos acompanhados nas áreas de Medicina Preventiva, Patologia Médica e Patologia Cirúrgica.

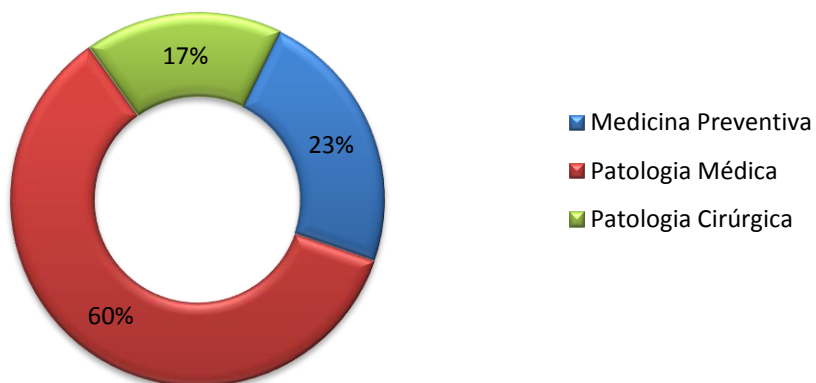


Gráfico 5 - Frequências relativas (%) dos casos acompanhados nas diferentes áreas da Patologia Médica.

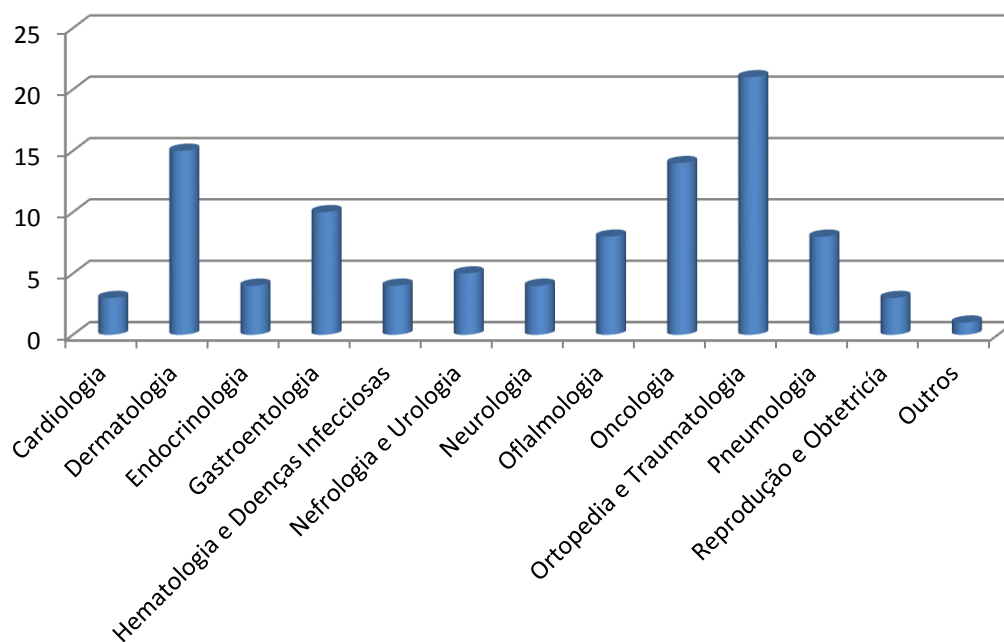


Gráfico 6 - Frequência relativa (%) das espécies animais acompanhadas nas consultas de Ortopedia e Traumatologia.

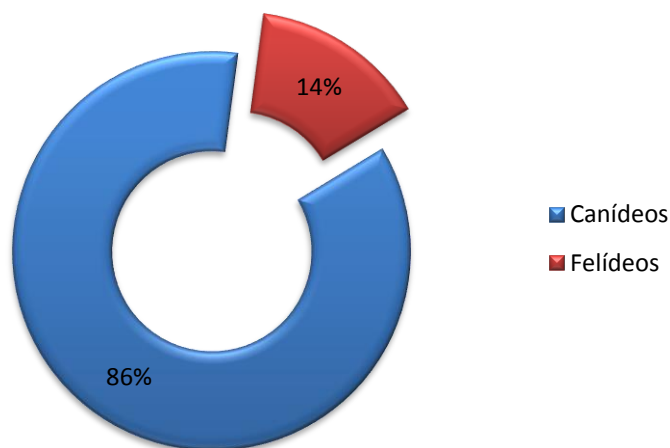


Gráfico 7 - Frequências relativas (%) dos casos acompanhados nas Consultas de Ortopedia e Traumatologia.

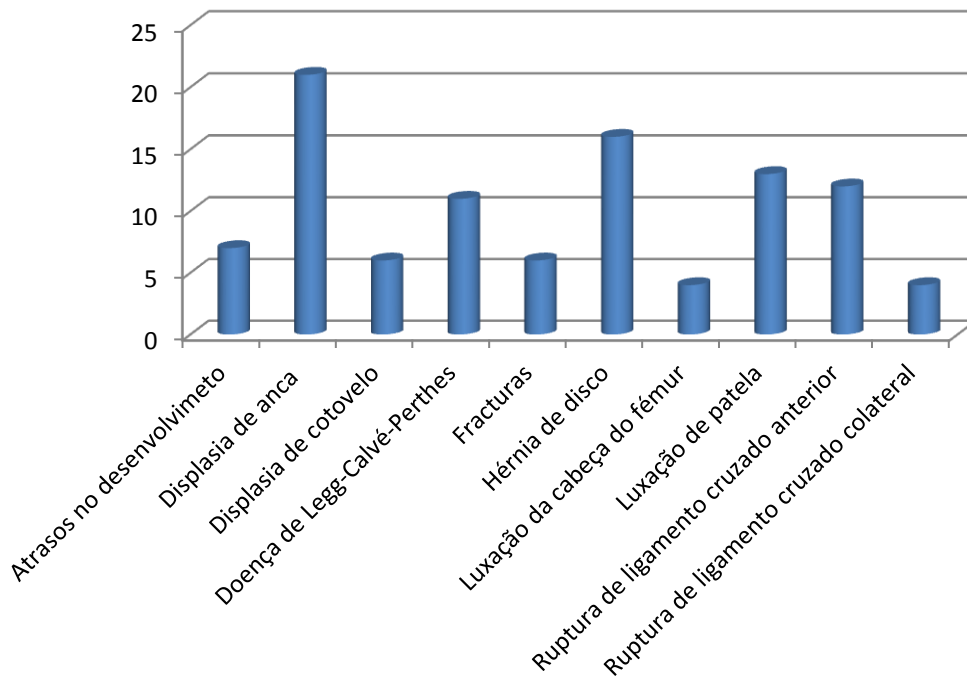


Gráfico 8 - Frequências relativas (%) referentes à casuística acompanhada em Cirurgia.

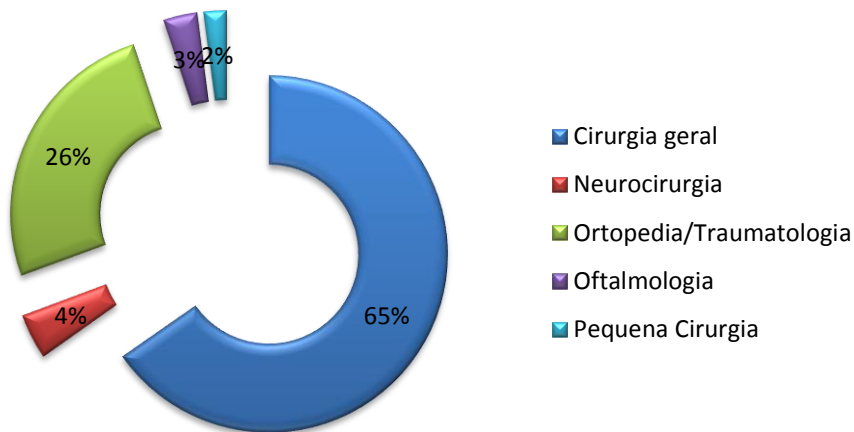
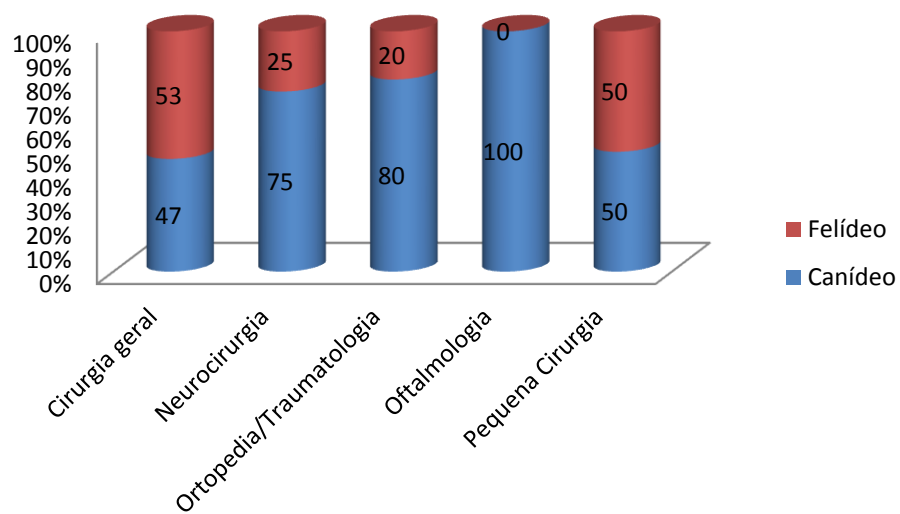


Gráfico 9 - Frequências relativas (%) referentes à casuística acompanhada em Cirúrgica, por espécie.



Anexo 2 - Caracterização do grupo estudo e controlo.

Tabela 12 - Caracterização do grupo em estudo.

Caso	Raça	Sexo	Idade	Condição Corporal	Peso (kg)	Função	Exercício	Animal de:	Articulação afectada	Causa primária	Dor	Manifestação evidente de dor	Início dos sinais clínicos (semanas)	Classificação Radiográfica
1	Indefinida	FC	2 anos	Normal	11,8	Companhia	Activo	Interior	Joelho esquerdo	LMP	Não		2	0
2	Pastor alemão	F	6 meses	Normal	23,8	Companhia	Activo	Interior	Cotovelo direito	NUPA	Sim	Não	2	4
3	Caniche	FC	8 anos	Obeso	4,3	Companhia	Sedentário	Interior	Joelho esquerdo	RLCA	Sim	Não	NA	3
4	Pastor Belga	F	4 anos	Normal	25	Trabalho	Activo	Exterior	Radiocárpica direita	Fractura e luxação	Não		8	4
5	Dogue Alemão	F	5 anos	Normal	69,1	Companhia	Activo	Exterior	Joelho direito	NA	Não		3	2
6	Beagle	MC	2 anos	Obeso	15,8	Companhia	Sedentário	Interior	Joelho direito	RLCA	Não		8	1
7	Weimaraner	FC	3 anos	Obeso	42	Companhia	Sedentário	Interior	Joelho direito	RLCA	Sim	Sim	4	3
8	Bulldog Inglês	F	3 anos	Normal	21,2	Companhia	Activo	Interior	Joelho direito	LMP	Não		4	1
9	Golden Retriever	F	5 anos	Obeso	37,2	NA	NA	Interior	Joelho direito	RLCA	Sim	Sim	4	2
10	Labrador Retriever	M	7 anos	Obeso	28	Companhia /Guarda	Sedentário	Exterior	Joelho esquerdo	RLCA	Sim	Sim	1	2
11	Indefinida	M	6 anos	Normal	8,7	Companhia	Activo	Exterior/ Interior	Joelho direito	RLCA	Sim	Sim	3	3
12	Labrador Retriever	M	8 anos	Normal	23	Companhia	Activo	Exterior/ Interior	Joelho direito	RLCA	Sim	Sim	2	3
13	Indefinida	M	6 anos	Normal	17	Companhia	Activo	Interior	Joelho direito	RLCA	Sim	Sim	3	2
14	Pincher Miniatura	MC	2 anos	Normal	1,8	Companhia	Activo	Interior	Joelho esquerdo	LMP	Não		8	1
15	Indefinida	F	4 anos	Normal	7	Companhia	Sedentário	Interior	Joelho esquerdo	RLCA	Sim	Sim	6	2
16	Indefinida	M	12 anos	Obeso	12	Companhia	Sedentário	Interior	Joelho direito	RLCA	Sim	Sim	0,5	3

Tabela 13 - Caracterização do grupo controlo.

Controlo	Raça	Sexo	Idade	Condição Corporal	Peso (kg)	Função	Exercício	Animal de:	Classificação Radiográfica
1	Bulldog Francês	M	8 meses	Normal	12,5	Companhia	NA	Interior	0
2	Spitz	F	1 ano	Normal	4,3	Companhia	Activo	Interior	0
3	Caniche	F	1,2 anos	Normal	6	Companhia	Activo	Interior	0
4	Yorkshier	F	1,5 anos	Normal	3,2	Companhia	Activo	Interior	0

Legenda Anexo 3:

F – Fêmea; FC – Fêmea Castrada; M – Macho; MF – Macho Castrado; NA – indeterminado, LMP – Luxação Medial de Patela, NUPA – Não União do Processo Ancóneo, RLCA – Ruptura de Ligamento Cruzado Anterior

Anexo 3 - Ficha de caracterização dos doentes.

Ficha de Registo de Dados para o Estudo de Variabilidade de Proteína C-Reactiva em Canídeos com Doença Degenerativa Articular

Caracterização do Maneio

Função: Companhia / Guarda / Trabalho **Exercício:** Activo / Sedentário **Nº de horas de exercício/dia:** ___h

Animal de: Exterior / Interior **Alimentação:** Caseira / Comercial **Qual?** _____

Caracterização do Doente

Doente nº _____ **Local:** _____ **Data:** ___/___/2013

Nome: _____ **Proprietário:** _____ **Contacto:** _____

Raça: _____ **Sexo:** M/F/MC/FC **Idade:** ___anos **Peso:** ___Kg **Condição corporal:** Obeso/Normal/Magro

Caracterização Clínica

Doenças de Base: Não / Sim **Quais?:** _____

Articulação afectada: _____ **Início dos sinais clínicos:** Agudo (Traumático?) / Progressivo

Sinais/sintomas clínicos: _____

Dor ao exame: Sim / Não **Fácil de elicitar:** Sim / Não

Terapêutica previa à consulta: Não / Sim **Qual?:** _____

Prescrição Médica: Não / Sim **Qual?:** _____

Início da Terapêutica: _____ **Resposta à Terapêutica:** Boa / Mediana / Nenhuma

Exames Complementares

Sinais ao Rx: _____

Classificação Radiográfica: _____

Diagnóstico: _____

Valores de Proteína C-Reactiva:

Soro: _____ **Líquido Sinovial:** _____

Anexo 4 - Classificação radiográfica dos doentes com DDA.

Tabela 14 - Gradação da DDA (adaptada da classificação Brunnberg, 1987).

Grau	Classificação	Características
0	Nulo	Sem sinais de Osteoartrose.
1	Duvidoso	Questionável diminuição do espaço articular e possível labiação osteofitária.
2	Leve	Presença de osteófitos e diminuição duvidosa do espaço articular.
3	Moderado	Diminuição do espaço articular, osteófitos, certo grau de esclerose e eventual deformidade óssea.
4	Severo	Grandes osteófitos, marcada diminuição do espaço articular, nítida esclerose subcondral e deformidades ósseas.



"PHASE"™ EIA Canine CRP Assay Cat. No. TP-803

Intended use

The activation of the body's immune system-mediated defence mechanisms is termed the acute phase response. Activation can occur due to infections, inflammation, tissue injury, neoplastic growth or immunological disorders. This assay is designed to detect the acute phase protein, C-Reactive protein, from the serum of dogs.

Note: This product is for research purposes only.

Introduction

C-Reactive Protein is one of the family of acute phase proteins found in the blood of both humans and animals. Under normal conditions it is found in low levels in the blood but can increase significantly in response to inflammatory conditions, infections and other disease states where tissue necrosis occurs, and therefore provides a highly sensitive indicator for these conditions.

Assay principle

The Tridelta Phase™ range canine CRP kit is a solid phase sandwich Immunoassay. Samples, including calibrators of known CRP content bind to coated microwells. After washing to remove any unbound material the HRP labeled Anti-canine-CRP antibody is added to each well. After again washing to remove any unbound material TMB substrate solution is added. The intensity of the colour produced is proportional to the concentration of CRP present in the original specimen.

Components Supplied

1. Coated microplate 1 x 96 well plate
2. C-Reactive protein calibrator 1 x 1.5ml (Ready to use)
3. Standard/sample diluent buffer 1 x 50ml (20x concentrate)
4. Anti-canine CRP Conjugate 1 x 11ml (Ready to use)
5. Wash concentrate 1 x 50ml (20x concentrate)
6. TMB Substrate 1 x 11ml (Ready to use)
7. Stop solution 1 x 11ml (Ready to use)
8. Information leaflet 1

Additional materials required

1. Serum collection equipment.
2. Microtiter plate reader capable of measurement at 450nm with reference at 630nm if available.
3. Accurate micropipettes and disposable tips to deliver 0-10µl, 20-200µl and 200-1000µl.
4. A repeat or multichannel pipette (50-200µl) for large assays.
5. Deionized or distilled H₂O.
6. Plate washer (automated or manual).
7. Graph paper: Standard or semi-log.
8. Glass or plastic test tubes.
9. Absorbent paper towels
10. 96 well dust plate cover.
11. 37°C incubator.
12. Timer

Storage and Stability

The kit components are stable when stored at 2-8°C until the expiry date indicated on the kit label.

Safety

- Never pipette by mouth.
- Wear disposable latex gloves and eye protection where appropriate.
- The stop solution and TMB substrate contain reagents that may irritate the skin or mucous membranes. Any reagent, which comes into contact with the skin, should be washed off with water immediately.

Sample Preparation

Samples

Specimens should be collected by venipuncture into serum collection tubes. Blood samples may be kept for up to 24 hours before separation of serum. However, it is best to remove serum from the clot as soon as possible after collection. In general, serum may be stored at 2-8°C for up to 24 hours or stored frozen at -20°C for longer periods without loss of CRP. It is important that all refrigerated samples are brought to room temperature and mixed to assure accurate determination of the CRP concentration.

All samples should be diluted 1:500 in sample diluent buffer (1x) prior to assay by addition of 10ul of sample to 5.0 ml diluent buffer (1x).

Do not use grossly haemolysed or lipaemic samples.

Reagent Preparation

Diluent Buffer (1x)

Dilute 1 volume of diluent buffer concentrate (20x) with 19 volumes of distilled water. Store both the diluent buffer concentrate and working diluent buffer (1x) in the refrigerator. Diluted diluent buffer is stable for up to 2 weeks when stored at 4°C.

Wash Buffer (1x)

Dilute 1 volume of wash buffer concentrate (20x) with 19 volumes of distilled water. Store both the wash buffer concentrate and working wash buffer (1x) in the refrigerator. Diluted wash solution is stable for up to 2 weeks when stored at 4°C.

Calibration curve preparation

Label 6 tubes C1 to C6. To prepare the top calibrator, add 250ul of the calibrator supplied with the kit to tube C1 (see table 1). Add 250ul 1x diluent buffer to each of the remaining tubes (C2-C6) as directed in table 1. The top calibrator is serially diluted 4 times (tubes C2 to C5) to provide the working calibrators as indicated in table 1 below. Tube C6 constitutes the assay blank and contains 1x diluent buffer only.

Table 1: Preparation of working calibration curve

Tube No.	CRP Concentration	Volume of calibrator	Volume of 1x diluent buffer	Serial dilution
C1 (Top calibrator)	120ng/ml	250µl	-	-
C2	60ng/ml	250µl	250µl	-
C3	30ng/ml	-	250µl	250µl of C2
C4	15ng/ml	-	250µl	250µl of C3
C5	7.5ng/ml	-	250µl	250µl of C4
C6 (Blank)	Blank		250µl	-

The range provided represents a CRP concentration of 3.75 – 60ug/ml when sample dilution of 1:500 is taken into account.

Procedure

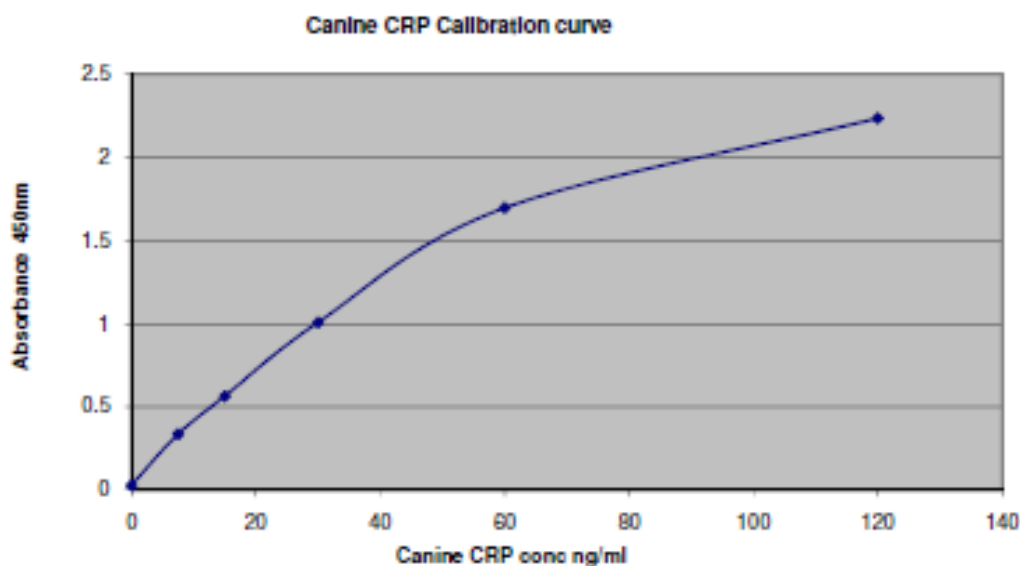
1. Determine the number of 8-well strips needed for the assay. Re-bag extra strips, seal bag and store desiccated in a refrigerator.
2. Add **100µl** of the diluted sample or calibrator, in duplicate, to each well.
3. Cover the plate with a dust cover and incubate the plate for **15 minutes at 37°C**.
4. After incubation aspirate or decant and wash the plate four times with diluted wash buffer. After the last wash tap the plate dry on absorbent paper.
5. Add **100µl** of conjugate to each of the wells.
6. Cover the plate with a dust cover and incubate the plate for **15 minutes at 37°C**.
7. After incubation aspirate or decant and wash the plate four times with diluted wash buffer. After the last wash tap the plate dry on absorbent paper.
8. Add **100µl** of TMB Substrate.
9. Cover the plate with a dust cover and incubate the plate for **15 minutes at room temperature**.
10. Add **100µl** of stop solution and tap gently to mix.
11. Read the absorbance of each well at 450nm using 630nm as a reference.

Interpretation of Test Results

1. Calculate the mean absorbance for each sample, control or calibrator.
2. Plot the absorbance of the calibrators against the calibrator concentration on **standard or semi-logarithmic** graph paper. (If necessary, the background absorbance for the 0ng/ml may be subtracted from each of the data points, including the calibrators, unknowns and controls prior to plotting). Draw the best smooth curve through these points to construct the calibration curve. Determine the concentrations of the test samples and controls from the calibration curve by multiplying the interpolated value by the appropriate dilution factor. Samples that have a signal greater than the top calibrator, or fall on the non-linear part of the curve, should be further diluted in diluent buffer and re-analysed.

Typical Data

An example of a typical calibration curve is represented below. This should not be used in the determination of canine CRP



Assay Reproducibility

Two samples containing medium and low levels of Canine CRP were run in independent assays. To determine inter assay reproducibility the mean and the coefficient of variation (%CV) were calculated.

Inter assay variation

Control	Level 1	Level 2
n	32	32
Mean ($\mu\text{g/ml}$)	14.9	34.6
Standard Deviation	1.2	2.7
%CV	8.2%	7.8%

Two samples containing medium and low levels of Canine CRP were tested in a single assay. To establish intra assay reproducibility the mean and the coefficient of variation (%CV) were calculated.

Intra assay Variation

Control	Level 1	Level 2
n	16	16
Mean ($\mu\text{g/ml}$)	15.4	35.8
Standard Deviation	1.1	2.3
%CV	6.9%	6.5%

Limitations of Test

The use of this test for the analysis of plasma samples has not been fully investigated. Haemolysed or lipaemic samples should not be used in the test.

Other "PHASE" acute phase assays available from Tridelta:

TP-801	Haptoglobin	Multispecies, colorimetric, rapid assay, may be used in a manual method or on a large range of autoanalysers.
TP-801-Cal	Haptoglobin	Haptoglobin calibrator (2mg/ml) for Haptoglobin kit (TP-801)
TP-801-Con	Haptoglobin	Haptoglobin controls for Haptoglobin kit (TP-801)
TP-802	Serum Amyloid A	EIA Multispecies Serum Amyloid A immunoassay.
TP-802-Con	Multispecies SAA	Multispecies SAA control for Multispecies SAA kit (TP-802)
TP-807	Milk MAA	EIA Amyloid A specific for milk.
TP-802M	Murine SAA	EIA Serum Amyloid A assay specific for mouse
TA-901	CRP-Porcine	EIA C-reactive Protein assay specific for Porcine
TP-803-Con	Canine CRP	Canine CRP controls for Canine CRP EIA kit (TP-803)

Contact details follow:

Tridelta Development Limited

Unit 7, Block F,
Maynooth Business Campus
Maynooth
Co. Kildare
Ireland.

Tel: +353 1 6290635
Fax: +353 1 6290687

e-mail: general@trideltaltd.com
Web page: www.trideltaltd.com

CR015-01-10(2)

Anexo 6 - Estatística descritiva da componente experimental.

Tabela 15 - Valores da idade (anos) dos dois grupos.

	Média (\pm desvio padrão)	Mediana	Mínimo	Máximo
Grupo em estudo	4,8 (\pm 2,9)	4,5	0,5	12
Grupo Controlo	1,1 (\pm 0,3)	1,1	0,67	1,5

Tabela 16 - Valores do peso (kg) dos dois grupos.

	Média (\pm desvio padrão)	Mediana	Mínimo	Máximo
Grupo em estudo	21,7 (\pm 16,9)	19,1	1,8	69,1
Grupo Controlo	6,5 (\pm 4,2)	5,2	3,2	12,5

Tabela 17 - Concentrações da PCR (mg/l) nos dois grupos.

	Tipo de amostra	Média (\pm desvio padrão)	Mediana	Mínimo	Máximo
Grupo Controlo	Soro	15,28 (\pm 16,91)	9,84	2,82	38,63
	Líquido Sinovial	3,70 (\pm 2,19)	3,20	1,90	6,51
Grupo em Estudo	Soro	3,49 (\pm 2,43)	2,82	1,95	11,72
	Líquido Sinovial	2,22 (\pm 0,59)	2,18	<1	3,55

Anexo 7 - Caracterização da condição corporal.

Tabela 18 - Tabela de caracterização da condição corporal (adaptado de Laflamme, 1997).

Condição corporal	Score	Descrição
Magro	Score 1	Costelas, vértebras lombares, ossos pélvicos e todas as saliências ósseas visíveis à distância. Não há gordura corporal discernível. Perda evidente de massa muscular
	Score 2	Costelas, vértebras lombares e ossos pélvicos facilmente visíveis. Não há gordura palpável. Algumas outras saliências ósseas podem estar visíveis. Perda mínima de massa muscular.
	Score 3	Costelas facilmente palpáveis podem estar visíveis sem gordura palpável. Visível o topo das vértebras lombares. Os ossos pélvicos começam a ficar visíveis. Cintura e reentrância abdominal evidentes.
Ideal	Score 4	Costelas facilmente palpáveis com mínima cobertura de gordura. Vista de cima, a cintura é facilmente observada. Reentrância abdominal evidente.
	Score 5	Costelas palpáveis sem excessiva cobertura de gordura. Abdome retraído quando visto de lado.
Obeso	Score 6	Costelas palpáveis com leve excesso de cobertura de gordura. A cintura é visível quando vista de cima, mas não é acentuada. Reentrância abdominal aparente.
	Score 7	Costelas palpáveis com dificuldade; intensa cobertura de gordura. Depósitos de gordura evidentes sobre a área lombar e base da cauda. Ausência de cintura ou apenas visível. A reentrância abdominal pode estar presente.
	Score 8	Impossível palpar as costelas situadas sob cobertura de gordura muito densa ou costelas palpáveis somente com pressão acentuada. Pesados depósitos de gordura sobre a área lombar e base da cauda. Cintura inexistente. Não há reentrância abdominal. Poderá existir distensão abdominal evidente.
	Score 9	Maciços depósitos de gordura sobre o tórax, espinha e base da cauda. Depósitos de gordura no pescoço e membros. Distensão abdominal evidente.

