

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**GABRIEL CARVALHO DOS SANTOS**

**CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NO LÍQUIDO SINOVIAL  
DE EQUINOS SUBMETIDOS À INFILTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE  
LIDOCAÍNA E BUPIVACAÍNA**

**Campos dos Goytacazes**

**Julho de 2019**

**GABRIEL CARVALHO DOS SANTOS**

**CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NO LÍQUIDO SINOVIAL  
DE EQUINOS SUBMETIDOS À INFILTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE  
LIDOCAÍNA E BUPIVACAÍNA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Campos dos Goytacazes**

**Julho de 2019**

GABRIEL CARVALHO DOS SANTOS

**CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NO LÍQUIDO SINOVIAL  
DE EQUINOS SUBMETIDOS À INFILTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE  
LIDOCAÍNA E BUPIVACAÍNA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Data da defesa: 01 de abril de 2019

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Eulógio Carlos Queiros de Carvalho (Doutor Patologia) – UENF

---

Antônio Peixoto Albernaz (Doutor Produção Animal) – UENF

---

José Dantas Ribeiro Filho (Doutor, Patologia e Ciências Clínicas) – UFV

---

Paula Alessandra Di Filippo (Doutora, Cirurgia Veterinária) - UENF  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus por ter me dado força para concluir mais essa etapa na minha vida.

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), a todos os professores e profissionais que me ajudaram a realizar esse trabalho, em especial, minha orientadora, Professora Paula Alessandra Di Filippo,

Agradeço muito aos meus familiares, meus amados pais, Carlos (Barba) e Cássia, minha irmã Patrícia e minha sobrinha Maria Luiza, por todo amor, educação, incentivo e confiança em mim depositada.

Aos meus avós que indiretamente estiveram comigo me ajudando a manter o equilíbrio nos momentos difíceis.

À minha namorada, Verônica, por ser companheira, pelas noites acordada que passou me apoiando e ajudado a superar as dificuldades encontradas.

À professora Karoll Andrea Afonso Torres, por ter cedido seu laboratório e ajudado inúmeras vezes, sempre disposta independente do dia e hora.

Ao professor Leandro Abreu da Fonseca e sua equipe da Universidade Federal de Viçosa, por abrirem as portas para contribuir com essa pesquisa.

Aos proprietários e amigos, Dr. José Renato Caiado, Dr. Marcos Barretos e ao Dr. Lério Gama Sales, pela confiança e por disponibilizar os animais para essa pesquisa.

Agradeço aos professores participantes da banca examinadora que dividiram comigo este momento tão importante e esperado: Prof. Eulógio Carlos Queiros de Carvalho, Prof. Antônio Peixoto Albernaz, Prof. José Dantas Ribeiro.

A todos não citados aqui, que de alguma forma contribuíram, meu muito obrigado.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar possíveis efeitos nocivos da lidocaína e da bupivacaína administradas via intra-articular em dose única através das proteínas de fase aguda presentes no líquido sinovial (LS). Para mensurar a resposta de fase aguda foram avaliados 20 equinos hípidos divididos em dois grupos. Grupo LID que foi composto por 10 cavalos que receberam a infiltração intra-articular de 5mL de lidocaína (2%) e o grupo BUP, 10 animais que receberam a infiltração intra-articular de 5mL de bupivacaína (0,05%). As articulações contralaterais de cada animal, dentro dos grupos, representaram o controle e receberam 5mL de solução salina (NaCl 0,9%). As proteínas de fase aguda foram mensuradas no LS e no sangue total nos tempos 0, 12, 24, 48, 168 e 360 horas após administração dos fármacos. A determinação das PFAs foi realizada por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SAEG, versão 9.1 sendo submetido à análise de variância, teste Tukey e correlação de Pearson com nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na resposta de fase aguda sérica e sinovial em função dos tratamentos (LID e BUP) bem como, na comparação com as articulações contralaterais controle. Entretanto foi possível observar diferença ( $P < 0,05$ ) nas respostas de fase aguda no decorrer dos momentos de avaliação quando se avaliou a cinética dessas proteínas individualmente, comparando-as com o valor basal (T0) de cada grupo. No grupo LID foi observado um aumento de haptoglobina (130,97%),  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (181,25%), albumina (- 36,75%) e transferrina (- 77,70%), enquanto a bupivacaína estimulou a síntese de transferrina (69,89%), IgG leve (- 69%) e IgG pesada (110,12%). As articulações que receberam a solução salina também apresentaram uma resposta de fase aguda com aumento de  $\alpha$ 1-antitripsina com 12 horas após a infusão. Os resultados demonstram que a lidocaína (2%) e a bupivacaína (0,5%), quando administradas intra-articular em dose única, estimulam uma resposta inflamatória articular. Do mesmo modo, a solução salina (NaCl 0,9%) também promove um estímulo inflamatório articular, diferente se comparada aos anestésicos, porém significativo.

**Palavras-chave:** Inflação, cavalo, claudicação.

## ABSTRACT

The present study aimed to identify the harmful effects of lidocaine and bupivacaine administered intra-articularly in a single dose through the action phase proteins present in the synovial fluid (SF). To measure an acute phase response, 20 healthy horses divided into two groups were evaluated. LID group was composed of 10 species that received intra-articular infiltration of 5 mL of lidocaine (2%) and the BUP group, 10 animals that received an intra-articular infiltration of 5 mL of bupivacaine (0.05%). The contralateral joints of each animal, within groups, they represent the control and receive 5mL of saline solution (0.9% NaCl). Phase proteins were not measured on SF and whole blood at times 0, 12, 24, 48, 168 and 360 hours after drug administration. The dosage of APP was performed by the technique of polyacrylamide gel electrophoresis. The data were consisted of the SAEG statistical software, version 9.1, being submitted to analysis of variance, Tukey test and Pearson Qtd with 5% significance level ( $p < 0.05$ ). The response of the acute and synovial phase in the treatment function (LID and BUP) is a change in the contralangida articulation. The acute phase responses during the evaluation moments were evaluated ( $P < 0.05$ ) when a kinetics of these proteins was evaluated individually, comparing them with the basal value (T0) of each group. No LID group was an increase in haptoglobin (130.97%), acid  $\alpha$ 1-glycoprotein (181.25%), albumin (-36.75%) and transferrin (-77.70%), while bupivacaine stimulated Synthesis transferrin (69.89%), mild IgG (-69%) and heavy IgG (110.12%). The joints received a saline solution with addition of 1 hour-antitrypsin at 12 hours after infusion. The results demonstrate that lidocaine (2%) and bupivacaine (0.5%), when administered intra-articularly in a single dose, stimulate an inflammatory joint response. Similarly, saline solution (NaCl 0.9%) also promotes a stimulus to joint contraction, different from anesthetics, but significant.

Key words: Inflation, horse, claudication.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração demonstrando divisão dos grupos experimentais.....	34
Figura 2. Artrocentese sendo realizada equino.....	35
Figura 3. Diagrama das coletas.....	36
Figura 4. Média das proteínas totais no líquido sinovial e no sangue total (g/dL) de acordo com os períodos observados. ....	39
Figura 5. Média da ceruloplasmina no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados. ....	39
Figura 6. Média da transferrina no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados. ....	40
Figura 7. Média da albumina no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados ....	41
Figura 8. Média da alfa1 antitripsina no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados. ....	42
Figura 9. Média da IgG pesada no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados. ....	42
Figura 10. Média da haptoglobina no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados. ....	43
Figura 11. Média da glicoproteína ácida no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados. ....	44
Figura 12. Média da IgG de cadeia leve no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados ....	44

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Médias e erro padrão das concentrações de Proteína Total, Ceruloplasmina, Transferrina e Albumina, presentes no líquido sinovial e no sangue, para cada grupo e sua articulação contralateral-controle (NaCl 0.9%). .....46
- Tabela 2. Médias e erro padrão das concentrações de  $\alpha$ 1–Antitripsina, IgG de cadeia pesada e Haptoglobulina, (mg/dL) presentes no líquido sinovial e no sangue, para cada grupo e sua articulação contralateral-controle (NaCl 0.9%). .....47
- Tabela 3. Médias e erro padrão das concentrações de Glicoproteína ácida, IgG leve (mg/dL) presentes no líquido sinovial e no sangue, para cada grupo e sua articulação contralateral-controle (NaCl 0.9%). .....48
- Tabela 4. Coeficientes de Pearson e grau de significância para determinar a correlação entre as articulações controles e as submetidas aos tratamentos, para os dez tipos de proteínas avaliadas. ....49

## ABREVIATURAS

AAT -  $\alpha$ 1-antitripsina

AGP -  $\alpha$ 1-Glicoproteína ácida

AL - Anestésico local

Alb - Albumina

Cp - Ceruloplasmina

LS – Líquido sinovial

LPS - Lipopolissacarídeos

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral Alfa

Hp - Haptoglobina

IgG Leve - imunoglobulina G de cadeia leve

IgG Pesada - imunoglobulina G de cadeia pesada

PFA - Proteínas de fase aguda

RFA - Resposta de fase aguda

Tr - Transferrina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GERAL .....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
3.1. Líquido sinovial .....	14
3.2. Proteínas de fase aguda .....	16
3.3. Condrototoxicidade dos anestésicos locais.....	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24
CAPÍTULO I: EFEITOS DA ADIMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE LIDOCAÍNA E BUPIVACAÍNA NA RESPOSTA DE FASE AGUDA NO LÍQUIDO SINOVIAL DE EQUINOS .....	
32	
1. INTRODUÇÃO .....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
2.1 COMISSÃO DE ÉTICA .....	33
2.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO .....	33
2.3 AMOSTRAGEM .....	33
2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	34
2.5 OBTENÇÃO DO LÍQUIDO SINOVIAL E SANGUE TOTAL .....	34
2.6 MOMENTOS DE COLETA.....	36
2.7 ANÁLISES LABORATORIAIS E FRACIONAMENTO ELETROFORÉTICO.....	36
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
3. RESULTADOS .....	38
4. DISCUSSÃO .....	50
5. CONCLUSÃO .....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

As lesões que envolvem as articulações dos equinos permanecem sendo a maior causa de redução no desempenho atlético destes animais (GRAUW, 2011). Cerca de 40% a 90% dos equinos de alto desempenho apresentam um ou mais episódios de claudicação durante suas vidas atléticas (WILSON e WELLER, 2011). Para minimizar as perdas associadas à claudicação, o diagnóstico precoce é fundamental para que se tenha um bom prognóstico. No entanto, a identificação e localização da claudicação é um grande desafio para o clínico (SWAAB, 2011). Muitas vezes o diagnóstico pode tornar-se um processo frustrante ao médico veterinário e oneroso ao proprietário, devido à grande parte das lesões não serem detectadas visivelmente (HARPER, 2000; DYSON et al., 2005). Neste sentido, a anestesia intra-articular é um procedimento rotineiro na clínica de equinos, no qual os anestésicos locais dessensibilizam a articulação, diminuindo ou eliminando a dor. Dessa forma, pode-se comparar o grau de claudicação antes e depois da realização do procedimento. A identificação da lesão é confirmada quando o foco doloroso é dessensibilizado (BAXTER e STASHAK, 2011). Além disso, esta técnica é empregada também no controle da dor pré e pós-operatória, após intervenções cirúrgicas ou artroscópicas (JOHNSTON et al., 2002; POLYDORO, 2006).

Os anestésicos locais têm por finalidade bloquear os impulsos nervosos pela inativação dos canais de sódio. Também produzem efeitos secundários significativos e/ou benéficos. Podendo atuar em outros receptores celulares que estão relacionados à ativação plaquetária, arritmias e a mecanismos de inflamações, produzindo uma resposta anti-inflamatória (METSAVAHT, 2010). Entretanto, existe uma crescente preocupação com o potencial citotóxico dessas substâncias e seus efeitos em longo prazo sobre o tecido articular. Propriedades condrotóxicas dos anestésicos locais têm sido relatadas em humanos e, também, em animais (ANDERSON et al., 2010; FARKAS et al., 2010; HENNING et al., 2010; PIAT et al., 2012; e MARTÍNEZ et al., 2017). Estudos conduzidos com o cultivo de condrócitos *in vitro* mostraram que esses anestésicos podem impedir o metabolismo dos condrócitos, acarretando apoptose e necrose destas células e, conseqüentemente, prejudicando a homeostasia da articulação (PARK et al., 2011). Além disso, as

lesões desencadeadas dependem da dose, tempo de infusão e do tipo de anestésico local utilizado (Chu et al., 2008). Estudos avaliando a condrotoxicidade dos anestésicos locais em animais vivos são limitados (PIAT et al., 2012).

As proteínas de fase aguda são componentes não específicos do sistema imune e possuem importante papel como biomarcadores de processos inflamatórios e/ou infecciosos. Sabe-se que estas contribuem para o restabelecimento da homeostase, limitando o crescimento bacteriano de forma independente, e sua síntese ocorre logo após a instalação de processos inflamatórios, infecção, trauma cirúrgico, estresse e neoplasias (MURATA et al., 2004). A eletroforese é um dos métodos mais comumente utilizados para identificar e quantificar as proteínas de fase aguda em fluidos biológicos, como plasma, soro ou líquido sinovial (LS) (FUJIMURA et al., 2006). O líquido sinovial de uma articulação normal é um ultrafiltrado de plasma modificado pela produção de ácido hialurônico, glicoproteínas e outras macromoléculas (DYCE, 2005). O aumento na concentração proteica no líquido sinovial ocorre devido a processos patológicos que levam a ruptura da barreira biológica (SERAKIDES, 2011). Além do fator físico, as proteínas podem ser induzidas por meio de o metabolismo articular dos sinoviócitos a produzirem citocinas como interleucinas 1 e 6, e fatores de necrose tumoral alfa (SIPE, 1994) em consequência, são capazes de desencadear uma resposta de fase aguda a qual, culmina com a produção das PFA<sub>s</sub> (GRUYS et al., 2005). O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar os efeitos da administração intra-articular de lidocaína e bupivacaína através da mensuração das proteínas de fase aguda sinoviais e séricas em equinos hípidos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

- Identificar e comparar os efeitos da administração intra-articular de lidocaína ou de bupivacaína através da mensuração das proteínas de fase aguda em equinos hígidos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar, quantificar e comparar as concentrações de proteínas de fase aguda contidas no líquido sinovial e séricas após infiltração intra-articular de lidocaína ou de bupivacaína;
- Comparar os resultados obtidos nas amostras sinoviais com as séricas.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Líquido sinovial

A claudicação representa um aspecto importante na Medicina Veterinária Equina e cerca de 30% das claudicações devem-se a enfermidades articulares (MENDE, 1988). O diagnóstico precoce das lesões articulares possui notável desvantagem quando comparado com as demais estruturas, levando-se em consideração o fato da cartilagem articular serem desprovidas de inervação, lesões articulares quando estão em fase inicial caracterizam-se clinicamente de forma silenciosa.

A maior parte das articulações móveis é formada por osso subcondral, cartilagem articular e cavidade articular, contendo fluido sinovial e membrana sinovial (SISSON, 1986). No entanto, outros elementos estruturais, como músculos, tendões, ligamentos, bursas e meniscos, também são necessários para fornecer função articular adequada (SLEDGE et al., 2001).

Embora existam modernas tecnologias capazes de realizar diagnósticos precoces, o exame do líquido sinovial é indispensável para identificar alterações articulares (TURNER, 2001; DYSON, 2005).

O líquido sinovial (LS) ou sinóvia, localizado no interior das cavidades articulares e bainhas tendíneas é formado por um ultrafiltrado de plasma, modificado pela produção de ácido hialurônico pela membrana sinovial. A principal função é fornecer nutriente e lubrificação para a cartilagem articular, reduzindo a fricção e o desgaste das cartilagens (CLYNE, 1987). Ele possui características viscoelásticas, cuja cor varia do amarelo-palha ao castanho (FLOYD e MANSMANN, 2007) e desempenham um papel importante na manutenção e regulação da fisiologia articular (LIU et al., 2016). Geralmente é encontrado em pequenas quantidades, porém em articulações maiores como nos equinos seu volume pode atingir aproximadamente 40 mL (DYCE, 2005). O termo sinovial foi introduzido por Paracelso e significa "como ovo", por ser claro e viscoso (AGHABEIGI et al., 1993), o nome é derivado do prefixo grego *syn* (com) e do sufixo latim *ovum* (ovo).

A manutenção e a homeostase da articulação são mediadas pelos componentes moleculares e celulares presentes no LS. As macromoléculas

possuem propriedades lubrificantes e são sintetizadas e secretadas pelos sinoviócitos presentes na membrana sinovial. O ácido hialurônico é a principal macromolécula sintetizada pelos sinoviócitos e tem por função oferecer propriedades viscoelásticas ao líquido, estando, também, envolvido na restrição das proteínas plasmáticas e na retenção da água no líquido sinovial (GHOSH e GUIDOLIN, 2002). Apesar do líquido sinovial ser um ultrafiltrado do plasma, ele compartilha muitas semelhanças em sua composição. Uma articulação saudável contém aproximadamente um terço das proteínas encontradas no plasma sanguíneo (CURTISS, 1964), e seus valores normais estão entre 0,92 a 2,5 g/dl (DI FILIPPO et al., 2014). As proteínas presentes no plasma atravessam a barreira hematosinovial em quantidades inversamente proporcionais ao seu peso molecular (CLYNE, 1987). A sua concentração no LS é influenciada pelo peso molecular, fluxo sanguíneo, concentração plasmática, permeabilidade vascular e metabolismo articular (BERTONE, 2003). As que possuem maior peso molecular, como fibrinogênio (340 kDa), têm concentrações relativamente baixas no LS, em contraste, as proteínas plasmáticas de baixo peso molecular como a albumina (69 kDa) e transferrina (90 kDa) estão em concentrações relativamente elevadas no LS (DI FILIPPO et al., 2014).

A anatomia da membrana sinovial atua como uma barreira biológica através dos capilares sinoviais que contêm fenestrações revestidas por uma fina membrana. Essa característica anatômica permite acesso limitado a moléculas de baixo peso molecular ao LS. O aumento da concentração proteica ocorre devido a processos patológicos que levam a ruptura da barreira biológica (SERAKIDES, 2011).

Apesar das articulações serem funcionalmente integradas com estruturas adjacentes (ligamentos, músculos, tendões) elas são estruturas autossustentáveis e não refletem em seu líquido sinovial alterações sistêmicas. Para que ocorra alteração no seu conteúdo, é necessário que a lesão tenha envolvimento da cartilagem articular ou na membrana sinovial (NILSSON e PERSSON, 1973). Um estudo conduzido por Martins et al. (2007) acompanhou o líquido sinovial da articulação femuropatelar de equinos após desmotomia patelar medial e observou que a cirurgia não alterou as proteínas sinoviais, mantendo a média de 2,5 g/dL.

Em cavalos que apresentam suspeita de lesão que envolva a membrana sinovial e a cartilagem articular, as proteínas sinoviais podem ser consideradas como um dos primeiros marcadores para qualquer processo inflamatório ou

infeccioso. Principalmente as proteínas de fase aguda (PFA) que surgem em estágio precoce do processo inflamatório e são atualmente, objeto de grande interesse (JACOBSEN, 2007).

### **3.2. Proteínas de fase aguda**

As proteínas são substâncias orgânicas formadas por aminoácidos unidos entre si, formando uma cadeia polipeptídica. São as macromoléculas mais abundantes do organismo, constituindo cerca de 50% do peso corporal. Esta biomolécula apresenta grande versatilidade funcional, das quais se destacam as atividades enzimáticas, de transporte, estruturais e imunológicas (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Algumas proteínas possuem características específicas podendo ser utilizadas como biomarcadores do processo inflamatório, sinalizadoras de doenças e, também, determinam diagnósticos e prognósticos. Estas proteínas são conhecidas como proteínas de fase aguda (ECKERSALL e BELL, 2010).

Essas proteínas são sintetizadas, principalmente pelos hepatócitos e que sofrem alterações na sua concentração sérica em resposta à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL)-6, IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que são liberadas, principalmente, por macrófagos (RUBIO et al., 2014).

Outro fator envolvido na produção e liberação das PFAs é o cortisol. Os corticosteroides são sintetizados e liberados quando necessários, não sendo estocados nas células adrenais. O principal estímulo para a sua secreção é o hormônio adrenocorticotrófico, ou corticotropina, produzido na adeno-hipófise (RODRIGUES, 2006). Quando o hormônio liberador da corticotropina sinaliza para adrenal a liberação do cortisol, este promove um efeito generalizado sobre o catabolismo tecidual, mobilizando aminoácidos da musculatura esquelética para a síntese hepática de PFA (RODRIGUES, 2006).

A cinética da resposta das PFAs varia em função da espécie animal e do tipo de agente indutor. Em geral, sua produção inicia-se entre seis e oito horas após a agressão e atinge a concentração máxima em torno de 24 a 48 horas após o início da resposta, diminuindo, assim, que se produz uma melhora no estado de saúde do animal (ECKERSALL, 2008).

Elas podem ser classificadas como positivas ou negativas. As negativas são aquelas que têm sua concentração diminuída durante a resposta de fase aguda que ocorre durante o processo inflamatório, enquanto as positivas têm a sua concentração aumentada (ECKERSALL, 2008). No primeiro grupo, enquadram-se, dentre outras, a glicoproteína ácida, haptoglobina, ceruloplasmina, macroglobulina e a amiloide A. No segundo grupo, destacam-se a albumina e a transferrina, cujos níveis séricos tendem a decrescer em condições inflamatórias (CERÓN et al., 2005).

As principais funções das PFAs dependem da interação destas com os ligantes de várias origens, formando complexos que são removidos pelos retículos endoplasmáticos ou hepatócitos. Com isso, poderão ocorrer inibição de proteases, neutralização de moléculas tóxicas e eliminação de membranas celulares (ALMEIDA, 2006). Elas também contribuem para o restabelecimento da homeostase, limitando o crescimento bacteriano de forma independente dos anticorpos, que aparecem logo após a instalação de processos inflamatórios, infecção, trauma cirúrgico, estresse e neoplasias (MURATA et al., 2004).

A maioria dessas proteínas é formada por glicoproteínas sintetizadas pelos hepatócitos, como resposta à injúria tecidual, e são encontradas na circulação sanguínea. Na dependência da espécie animal, as PFA são consideradas indicadores mais fiéis da resposta sistêmica frente aos processos inflamatórios e infecciosos, quando comparadas a outras variáveis, tais como febre, aumento da taxa de hemossedimentação e/ou presença de leucocitose associados à neutrofilia (JAIN, 1989). Atualmente, o método mais utilizado para a detecção das PFAs é a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Este consiste no fracionamento das proteínas de acordo com sua massa molecular, o que possibilita acompanhar a purificação das proteínas, que aparecem como uma banda única no gel ou em duas bandas caso a proteína possua duas subunidades de tamanhos diferentes (WILSON e WALKER, 2009). Sua identificação é dividida em grupos: alfa1-globulinas ( $\alpha$ 1-antitripsina e  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida), alfa2-globulinas (haptoglobina e ceruloplasmina), Beta-globulina (transferrina) e Gama-globulinas (IgA e IgG).

A execução da eletroforese é relativamente simples, com apenas pequenas quantidades de amostra, é possível determinar de 20 a 30 proteínas com concentrações extremamente baixas (RUBIO et al., 2014). Muitos estudos ainda são realizados para descrever o comportamento das PFA nas diferentes espécies

animais diante das diversas doenças às quais estão submetidas. Um estudo realizado em 2014 por Di Filippo et al. (2014) através da eletroforese em gel de poliacrilamida determinaram o proteinograma do líquido sinovial de 40 equinos hígidos. Tais autores encontraram 16 a 26 proteínas de fase aguda no fracionamento eletroforético, algumas identificadas nominalmente, sendo elas, a albumina, ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina,  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida, IgA e IgG.

Sobre a função biológica da resposta das proteínas de fase aguda, MURATA et al. (2004) afirmaram que, apesar de as PFA produzirem uma resposta a uma injúria tecidual, podem participar da proteção ao hospedeiro. A Haptoglobina (Hp) é uma glicoproteína formada por duas subunidades polipeptídicas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) de 108.000 e 105.000 daltons de peso molecular. Sua produção é hepática e pode ser encontrado dentro da fração  $\alpha$  2-globulina (POLLOCK, 2015). É uma proteína plasmática que se liga à hemoglobina livre liberada de eritrócitos com a finalidade de inibir a atividade oxidativa. O complexo haptoglobina-hemoglobina é usado para visualizar e monitorar anemia hemolítica intravascular (JAIN et al., 2011). Esta é encontrada em menor concentração nos equinos, porém permanece por um período maior nos animais afetados por vírus e artrite. Demonstrando-se ser um bom marcador de inflamação sistêmica, cujos sinais clínicos duram por sete dias. Em equinos, aumento sérico da haptoglobina foi observado após procedimentos cirúrgicos, processos inflamatórios experimentais, bem como durante doenças naturais. A utilização da Hp como marcadora inflamatória em equinos foi descrita também em animais com artrite por Hulten et al. (2002), onde avaliou a resposta inflamatória sistêmica durante artrite não infecciosa induzida com anfotericina B em 24 equinos de raça Standardbred. Neste estudo foi observado que com uma única dose de anfotericina B intra-articular deu origem a uma resposta de fase aguda sistêmica mensurável que persistiu por 15 dias, mostrando que esta proteína pode ser utilizada para monitorar artrites agudas em equinos.

A ceruloplasmina está presente no soro, também, sob a forma de alfa - 2 glicoproteína (JACOBSEN, 2007) e, da mesma forma que a Hp, esta é uma PFA positiva de nível moderada, esta apresenta os níveis séricos aumentados nos processos inflamatórios, infecciosos, virais e parasitários, enquanto o decréscimo é observado ao nascimento, desnutrição, deficiência na absorção de nutrientes, nefrose e moléstias hepáticas associadas à intoxicação de cobre (JAIN, 1993).

Podendo ser detectada na circulação 24 horas após o trauma e sua concentração alcança pico máximo em quatro dias (MURATA et al., 2004). Biologicamente, ela é responsável pelo transporte do cobre sérico, utilizado na eritropoiese e como antioxidante tecidual, protegendo os tecidos do oxigênio tóxico, oriundo da fagocitose de micro-organismos, nos processos inflamatórios. A ceruloplasmina desempenha ainda atividade de ferroxidase, auxiliando na oxidação do ferro da forma ferrosa para férrica. Apresenta meia vida de aproximadamente quatro dias (CÉRON e MARTÍNEZSUBIELA, 2004). Em equinos foram descritos níveis sinoviais de Cp elevados em muar com osteoartrite desencadeada por deformidade flexural.

A região alfa - 1 é composta por quatro proteínas específicas, entretanto, a proteína mais importante e responsável por evidenciar essa zona na eletroforese é a alfa - 1 antitripsina. Geralmente, há aumento dessa fração em processos inflamatórios, infecciosos e imunes, de forma inespecífica (ECKERSALL, 2008). Esta proteína é a mais abundante da fração alfa-1, correspondendo a 90% do pico normal e desempenha importante papel como inibidor de proteases, por neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas, tanto de origem bacteriana quanto leucocitária (McGAVIN e ZACHARY, 2007). Sua síntese ocorre em resposta a processos inflamatórios agudos, sendo, por isso, um importante marcador de fase aguda (CÉRON et al., 2005).

No mesmo grupo, a glicoproteína ácida (AGP) é outra globulina de particular interesse clínico, possui duas funções fisiológicas principais, a ligação com fármacos distintos e metabólitos endógenos e/a imunomodulação (MURATA et al., 2004). Além disso, auxilia na remoção de lipopolissacarídeos (LPS) da circulação através da ligação direta com o LPS e, assim, neutralizando sua toxicidade (MOORE et al., 2000). Dependendo do estímulo, a elevação sérica da AGP geralmente inicia-se cinco dias após sua ativação, atingindo o pico máximo em sete dias (MURATA et al., 2004).

As  $\beta$  globulinas são compostas por um grupo heterogêneo de proteínas, das quais, a de maior relevância clínica é a transferrina, sua síntese é feita pelos hepatócitos cuja principal função é o transporte do ferro plasmático, atuando na absorção intestinal e distribuição orgânica deste, sendo a única proteína transportadora de íons (CÉRON et al., 2005). Apresenta uma importante atividade antibacteriana por não disponibilizar o ferro para as bactérias durante o processo inflamatório. Durante um processo inflamatório ou nos casos de anemia proveniente

de doença crônica, os níveis séricos desta proteína tendem a diminuir, caracterizando-a como uma PFA negativa. Sua vida média é de aproximadamente 8 a 10 dias e responde com rapidez a mudanças no estado nutricional, porém, suas concentrações são afetadas por diferentes patologias, inclusive insuficiência hepática, inflamações, insuficiência cardíaca e alterações no metabolismo do ferro (CERÓN et al., 2005). Em equinos a ceruloplasmina e a haptoglobina foram utilizadas para monitorar no prognóstico de equinos com cólica que vieram a óbito (FAGLIARI et al., 2007).

No grupo das PFA negativas a albumina é a proteína de fase aguda mais abundante no plasma, representou em um estudo, 52,80% das proteínas séricas como descrito por Di Filippo et al. (2014). Neste mesmo estudo, achados semelhantes foram encontrados no líquido sinovial, a albumina representou 57,7% das proteínas sinoviais. A albumina é considerada fonte importante de reserva proteica, bem como transportadora de ácidos graxos livres, aminoácidos, metais, cálcio, hormônios e bilirrubina, participa da regulação do pH sanguíneo, atuando como ânion. É uma proteína negativa de fase aguda, que tende a diminuir sua concentração sérica diante de um processo inflamatório.

Já as gamaglobulinas é uma zona que engloba todas as classes de imunoglobulinas, distribuídas em duas regiões distintas, gama-1 e gama-2, na eletroforese. As imunoglobulinas IgA, IgM e IgE são encontradas primariamente na região gama-1 e a IgG, que é a globulina que mais se destaca, na região gama-2. A IgG é a imunoglobulina mais evidente no traçado, o aumento está relacionado com doenças infecciosas, doenças do tecido conjuntivo, doenças hepáticas, mielomas e outros tumores do sistema retículo endotelial (TIZARD, 2008). Sua função está relacionada com a eliminação de agentes bacterianos, por meio da fagocitose. Assim, em infecções sistêmicas, a resposta imune humoral caracteriza-se por altos títulos de IgG (CERÓN et al., 2005). Adicionalmente, temos a proteína IgA que, em animais domésticos, atua como anticorpo secretório dentro do trato intestinal e dos pulmões, sendo capaz de neutralizar vírus e prevenir aderências de patógenos bacterianos aos tecidos-alvo (JAIN, 1993).

As PFAs são principalmente produzidas no fígado, em resposta à inflamação sistêmica e são caracterizadas por um rápido aumento acentuado em resposta à inflamação e rápido retorno à normalidade após a resolução da doença. No entanto, em resposta a estímulos da inflamação local, ocorre uma síntese extra-hepática em

equinos como amiloide sérico A (SAA) e haptoglobina, descrita em vários tecidos, incluindo o epitélio intestinal de ratos (SONAGLIO, 2013). A concentração de PFAs circulantes varia de acordo com a gravidade do processo e extensão de lesão tecidual. A determinação dessa concentração é útil para o auxílio no diagnóstico e prognóstico de distúrbios inflamatórios, além de possibilitar o monitoramento de uma determinada terapia e para avaliar o estado de saúde (BELL et al., 2008; ECKERSALL, 2008).

### **3.3. Condrotoxicidade dos anestésicos locais**

Dúvidas começaram a surgir acerca da segurança dos anestésicos locais administrados no interior de uma articulação, quando estudos demonstraram a ocorrência de condrólise da articulação glenoumeral, pós-artroscopia em humanos (HANSEN et al., 2007). No entanto, estudos anteriores na medicina veterinária já teriam sido descritos eventuais alterações citotóxicas dos anestésicos locais. Em 1985 foram publicados os primeiros efeitos da bupivacaína na cartilagem articular de suínos e caninos, por Nole et al. (1985). Eles descobriram que uma incubação *in vitro* de 2 horas em 0,25% e a 0,5% de bupivacaína diminuiu significativamente a produção de proteoglicanos dos condrócitos 24 horas após infusão. Também, realizaram injeções únicas de bupivacaína a 0,5% *in vivo* em joelhos de suínos e cães e, novamente, observaram uma diminuição na síntese de proteoglicanas 6 horas após a injeção. No entanto, em ambos, o metabolismo dos condrócitos foi restaurado ao normal na cartilagem examinada 72 horas após a aplicação.

Em 2004, Dogan et al. (2004) estudaram os efeitos de uma única injeção de bupivacaína a 0,5% *in vivo* em articulações do joelho de coelho, neste estudo, a avaliação foi realizada com 24 horas, 48 horas e 10 dias após administração do fármaco. Os resultados incluíram alterações inflamatórias na cartilagem articular, hiperplasia e hipertrofia de células da membrana sinovial e infiltração de células inflamatórias. A cartilagem articular exposta à bupivacaína apresentou níveis significativamente mais altos em todos os momentos, em comparação com o controle solução salina.

Além da dose, o tempo de infusão também está associado com o potencial condrotóxico dos anestésicos locais. Um dos primeiros estudos em animais que

avaliou este fator utilizou a bupivacaína na concentração de 0,5% por 30 minutos e foram relatados 42% de morte de condrócitos na cartilagem articular bovina (CHU et al., 2006). A viabilidade reduzida dos condrócitos tem sido encontrada, desde então, com diferentes concentrações de lidocaína, bupivacaína e ropivacaína de uma maneira dependente da dose e da duração (LANE e BRIGHTON, 1974).

Um estudo in vivo em cartilagem de ratos encontrou redução da densidade de condrócitos seis meses após uma única exposição a 0,5% de bupivacaína, indicando que esse efeito é mantido pelo menos em médio prazo (CHU et al., 2010). Scheffel et al.(2010) resumiram 100 casos de condrólise glenoumeral e observaram que os sinais clínicos de lesão articular começaram entre 42 e 730 dias após a cirurgia, enquanto um diagnóstico radiográfico foi feito entre 90 e 1095 dias após a cirurgia. Portanto, mesmo com grandes doses de anestésicos locais administrados por infusão contínua, pode levar até três anos para o diagnóstico se tornar aparente. Com doses menores, quaisquer efeitos adversos podem levar vários anos para se desenvolver. Porém as lesões normalmente de forma errônea são atribuídas à patologia para a qual a infiltração foi indicada (ABHINAV et al., 2017).

As sequelas da condrotoxicidade dos anestésicos locais são bem relatadas em seres humanos e em algumas espécies animais, mas o conhecimento dos efeitos tóxicos sobre os condrócitos equinos é limitado. PIAT et al. (2012) avaliou os efeitos da lidocaína (2%) nas articulações tarsocrômicas e da bupivacaína (0,5%) nas articulações intercarpianas dos equinos. Foram avaliadas seis articulações para cada tratamento, que visaram o metabolismo da cartilagem articular. Após duas semanas da infiltração ambos tratamentos demonstraram aumento nos marcadores de síntese da matriz de cartilagem, sugerindo um efeito anabólico. A bupivacaína também resultou em uma diminuição na concentração dos marcadores de degradação de colágeno.

Os efeitos in vitro da viabilidade celular de gene IL-1 $\beta$ , IL-6 ou TNF- $\alpha$  de sinoviócitos e condrócitos de equinos expostos a mepivacaína (4,4 mg/ml), bupivacaína (2,2 mg/ml), morfina (2,85 mg/ml) e sulfato de magnésio (37 mg/ml) sozinhos ou cada anestésico local mais morfina ou sulfato de magnésio ou ambos juntos, foram descritos por Martínez et al. (2017) onde puderam avaliar que a morfina sozinha, o sulfato de magnésio sozinho ou a sua combinação não alterou a viabilidade celular ou a expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6 ou TNF- $\alpha$ . No entanto, os anestésicos locais isolados ou em combinação com morfina e/ou sulfato de

magnésio reduziram a viabilidade celular e aumentaram a expressão gênica de IL-1 $\beta$ , IL-6 ou TNF- $\alpha$ . Diante dos achados, os autores concluíram que a curta exposição aos anestésicos locais é tóxico para condrócitos e sinoviócitos e sua combinação com morfina e/ou sulfato de magnésio aumenta os efeitos citotóxicos.

Alguns autores tentaram investigar o mecanismo dessa toxicidade do anestésico local. Dragoo et al. (2010) sugeriram que esse efeito adverso poderia estar relacionado à presença de epinefrina, do conservante e o baixo pH dessas soluções. Henning et al.(2010) descobriram que a bupivacaína com o conservante metilparabeno causou mais morte por condrócitos do que a bupivacaína sozinha, 5 min após a exposição. Entretanto, Chu et al. (2008 e 2006) demonstraram não haver diferença in vivo na viabilidade celular superficial ou escores histológicos entre a bupivacaína sem conservantes e o controle salino, durante um período de 1 semana até 6 meses, no entanto, encontraram morte de condrócitos seis meses após a exposição à bupivacaína sem conservante, indicando que os conservantes não são a principal causa de toxicidade.

Outra hipótese foi proposta por Bogatch et al. (2010), quando eles descobriram que havia uma reação de cristalização entre o anestésico, o meio de cultura e o líquido sinovial, sugerindo uma incompatibilidade entre o líquido sinovial e o anestésico local, resultando em toxicidade dos condrócitos. A condrotoxicidade está relacionada a danos ao DNA mitocondrial nos condrócitos, levando à morte celular. (GRISHKO et al., 2010). Embora isso possa explicar o mecanismo de morte celular em um nível molecular, o efeito da adição de epinefrina ou conservantes ou baixo pH na toxicidade dos anestésicos locais ainda não está claro e precisa ser investigado.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHINAV, G.; SHALIN, S.; PINELOPI, L. N. Glucosamine reduces the inhibition of proteoglycan metabolism caused by local anaesthetic solution in human articular cartilage: an in vitro study. **Journal of Experimental Orthopaedics**, v. 4, n. 1, p. 37 - 46, 2017.

ANDERSON, S.L.; BUCHKO, J.Z.; TAILLON, M.R.; ERNST, M.A. Chondrolysis of the glenohumeral joint after infusion of bupivacaine through an intra-articular pain pump catheter: a report of 18 cases. **Arthroscopy**, v. 26, n.4, p. 61 - 69, 2010.

AGHABEIGI, B.; HENDERSON, B.; HOPPER, C.; HARRIS, M. Temporomandibular joint synovial fluid analysis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 31, n.1, p.15 - 20, 1993.

ALMEIDA, A.H. **Dinâmica de proteínas de fase aguda e mensurações ultrasonográficas no conceito durante o período gestacional em cadelas da raça Boxer**. Tese de Doutorado em Ciências - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - São Paulo - p.110, 2006.

BERTONE, A.L. Non-Infectious Arthritis. IN: M.W. Ross, S.J. Dyson, **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Philadelphia: Saunders Company, p. 601 - 609, 2003.

BELL, R.; ECKERSALL, D.; TORRANCE, A. Laboratory updates: Acute phase protein tests for diagnosis and monitoring of disease in small animals. **Uk Veterinary**, v. 13, n. 9, p. 1 – 4, 2008.

BOGATCH, M.T.; FERACHI, D.G.; KYLE, B.; POPINCHALK, S.; HOWELL, A. Is chemical incompatibility responsible for chondrocyte death induced by local anesthetics? **American Journal Sports Med**, v. 38, n.3, p. 520-526.PMID 20194957, 2010.

CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p.85-99, 2005.

CHU, C.R.; IZZO, N.J.; PAPAS, N.E.; FU, F.H. In vitro exposure to 0.5% BUPivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. **Arthroscopy**, v. 22, n. 7, p. 693 – 702, 2006.

CHU, C.R.; COYLE, C.H.; CHU, C.T. Efeitos in vivo da injeção intra-articular única de BUPivacaína a 0,5% na cartilagem articular. **American Journal Sports Med**, v. 92, n. 3, p. 599 – 608, 2010.

CHU, C.R.; IZZO, N.J.; COYLE, C.H.; PAPAS, N.E.; Logar, A. The in vitro effects of bupivacaine on articular chondrocytes. **American Journal Sports Med**, v. 90, n. 6, p. 814 – 834, 2008.

CLYNE, M. J. Pathogenesis of degenerative joint disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 1, p. 15 - 18, 1987.

CURTISS, P.H. Changes produced in the synovial membrane and synovial fluid by disease. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 46, n. 4, p. 873 – 900, 1964.

DI FILIPPO, P.A, SANTOS, G.C.; GRAÇA, F.A.S.; SILVA, F.A.; ARACELLE. N.; AUREO, E.A.; SANTANAI, E. Proteinograma do líquido sinovial de equinos hígidos obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Ciência Rural**, Santa Maria v. 44, n. 7, p.1268-1271, 2014.

DOGAN, N., ERDEM, A.F.; ERMAN, Z.; KIZILKAYA, M. The effects of bupivacaine and neostigmine on articular cartilage and synovium in the rabbit knee joint. **Journal of Internal Medicine**, v. 32, n. 5, p. 513 – 522, 2004.

DRAGOO, J.L.; BRAUN, H.J.; KIM, H.J.; PHAN, H.D.; GOLISH, S.R The in vitro chondrotoxicity of single-dose local anesthetics. **American Journal Sports Med**, v. 40, n. 4, p. 794 – 799, 2012.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Tratado de anatomia veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, cap. 5, p. 117-138, 2010.

DYSON, S.J.; MURRAY, R.; SCHRAMME, M.C. Lameness associated with foot pain: results of magnetic resonance imaging in 199 horses (January 2001-December

2003) and response to treatment. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 2, p.113 – 121, 2005.

ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics and the dysproteinemias; In: KANEKO,J.J.; HARVEY, J. W.;BRUSS M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6 th ed. Burlington: Academic Press, p 117 -155, 2008.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23 - 31, 2010.

FARKAS, B.K.; T.; ILLÉS, T.; BÁRDOS,T. Increased chondrocyte death after steroid and local anesthetic combination. *Clin Orthop Relat Res*, v. 468, n. 11, p. 3112 – 332, 2010.

FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L.; SILVA, P.C.; PEREIRA, G.T. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo e submetidos à laparotomia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.2, p.322-328, 2008.

FAGLIARI, J.J.; PASSIPIERI, M.; OKUDA, H.T.; SILVA, S.L.; SILVA, P. C. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1355-1358, 2007.

FUJIMURA, Y.; HOTOKEZAKA, H.; OHARA, N.; NAITO, M. The Hemaglobin Receptor Protein of Porphyromonas Gingivalis Inhabits Receptor Activator NF-KB Ligand-Induced Osteoclastogenesis from Bone Marrow Macropages. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2544-2551, 2006.

GHOSH, P.; GUIDOLIN, D. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? **Semin Arthritis Rheum**, v.32, n.1, p.10-37, 2002.

GONZALEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 2ª ed. Porto Alegre: **Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, cap. 8, p. 318-337, 2006.

GRISHKO, V.; XU, M.; WILSON, G., PEARSALL, A.W. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.92, n.3, p.609–618, PMID 20194319, 2010.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of zhejiang university-science A**, v.6, n.11, p. 1045-1056, 2005.

HANSEN, B.P.; BECK, C.L.; BECK, E.P.; TOWNSLEY, R.W. Postarthroscopic glenohumeral chondrolysis. **American Journal Sports Med**, v.35, n.10, p.1628 - 1662, 2007.

HARPER, D. L. The value of infrared thermography in a diagnosis and prognosis of injuries in animals. In: **Proceedings of Inflammation**, Orlando, USA; p.115-122, 2000.

HULTEN, C.; GRÖNLUND, U.; HIRVONEN, J.; TULAMO, R. M.; SUOMINEN, M. M.; MARHAUG, G.; FORSBERG, M. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and  $\alpha_2$ - globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.34, n.7, p.699 - 704. 2002.

JANNY, C. G. Monitoramento Molecular da Homeostase Equina Articular. **Veterinary Quarterly**, v.31, n.2, p.77-86, 2011.

JACOBSEN, S. Review of equine acute-phase proteins. **Annual convention of the american association of equine practitioners (AAEP)** Orlando: University of Florida, v.53, p.230 – 235, 2007.

JAIN, N.C. The plasma proteins, dysproteinemias, and immune deficiency disorders. In: JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Saunders, p.349-380, 1993.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute phase proteins: As diagnostic tool. **Journal Pharmaceutical of and Biomedical Sciences**, v.3, n.1, p.118 - 127, 2011.

JONHSTON, G.M.; EASTMENT, J.K.; WOOD, J.L.N.; TAYLOR, P.M. the confidential enquiry into perioperative equine fatalities (CEPEF): Mortality results of phases 1 and 2. **Vet. Anaesth. Analg.**, v.29, n.4, p.159-170, 2002.

LANE, J.M.; BRIGHTON, C.T. Modelo de órgão de cartilagem articular de coelho in vitro. Morfologia e metabolismo dos glicosaminoglicanos. **Arthritis Rheum**, v.17, n. 3, p. 235 – 243, 1974.

LIU, F.; CHAUDHARY, R.; BLOCK, W. F.; SAMSONOV, A.; KIJOWSKI, R. Multicomponent T2 analysis of articular cartilage with synovial fluid partial volume correction. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v.43, n.5, 1140-1147, 2016.

MANKIN, H.J.; LIPPIELLO, L. The Turnover of Adult Rabbit Articular Cartilage. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.51, n,8, p.1591 – 1600, 1969.

MARTINS, E.A.N.; SILVA, L.C.L.C, BACCARIN, R.Y.A. Líquido sinovial da articulação femuropatelar após desmotomia patelar medial experimental em eqüinos. **Ciência Rural**, v.37, n.3, 784-788, 2007.

McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia e Veterinária**. 4<sup>a</sup> .eEd. Rio de Janeiro: Elsevier, p.1476, 2007.

MENDE, G.A.G. Allotransplantation of synovial fluid in equine species as a therapeutic alternative in some arthropathies and synovial effusions. **Equine Practice**, v.10, n.7, p. 27-30, 1988.

MOORE, D.F.; TSENOVA, LIANA.; CORRAL, LAURA. FREEDMAN, V.H.; KAPLAN, G. Human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein inhibits TNF production in the CNS of rabbits with meningitis: A report of preliminary observations. **Inflammation**, v.24, n.3, 2000.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v.168, n.1, p.28-40, 2004.

MURI, E.M.F.; SPOSITO, M.M.M.; METSAVAHT, L. Efeitos secundários potencialmente desejáveis dos anestésicos locais. **Acta Fisiátrica**, v.17, n.1, p.28-33, 2010.

NILSSON, G.; PERSSON, L. Changes in the synovial fluid of equine fetlock joints with lesions in the cartilage and joint capsule. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.44, p.99-107, 1973.

NOLE, R.; MUNSON, N.M.; FULKERSON, J.P. bupivacaína e efeitos salinos na cartilagem articular. **Artroscopia**, v.1, n 2, p.123 – 127, 1985.

PARK, J.; SUTRADHAR B.C.; HONG, G.; CHOI, S.H.; KIM, G. Comparison of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine in equine articular chondrocytes. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.38. n.2, p.127–133, 2011.

PIAT, P.; RICHARD, H.; BEAUCHAMP, G.; LAVERTY, S.. Perrine et al. In Vivo Effects of a Single Intra-Articular Injection of 2% lidocaine or 0.5% bupivacaine on Articular Cartilage of Normal Horses. **Vet Surg**. v.41, n.8, p. 1002-1010, 2012.

POLYDORO, A.S. **Estudo “in vitro” e “in vivo” da administração subaracnóide de opióides hiperbáricos em cavalos**. Tese de Doutorado programa de Pós-Graduação em medicina veterinária, universidade federal de santa Maria – RS, 2006.

POLLOCK, P.J.; PRENDERGAST, M.; SCHUMACHER, J.; BELLENGER, C.R. Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. **Veterinary Record**, v.156, n.17, p.538 – 542, 2005.

RODRIGUES, V. **Hemograma, teores séricos de proteínas e de cortisol de fêmeas caninas (Canis familiaris – LINNAEUS, 1758) submetidas à operação cesariana**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP. 2006.

RUBIO-MARTÍNEZ, L.M.; RIOJA, E.; CASTRO MARTINS, M.; WIPAWEE, S.; CLEGG, P.; PEFFERS, M.J. Local anaesthetics or their combination with morphine and/or agnesium sulphate are toxic for equine chondrocytes and synoviocytes in vitro. **Veterinary Research**, v.13, n.1, 2017.

RUBIO, C.P.; SCHMIDT, E.M.S. Proteínas de fase aguda em cães: Possíveis aplicações em cirurgia. **Vet. e Zootec**, v.21, n.4, p.492-502, 2014.

SERAKIDES, R. Ossos e articulações. In: Santos, R. L.; Alessi, A. C. **Patologia veterinária**. São Paulo: Roca, p.647- 696, 2011.

SIMPLICIO, K.M.M.G.; SOUSA, F.C.; FAGLIARI, J.J.; SILVA, P.C. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.5, p.1339-1347, 2013

SIPE, J.D. The chemistry and biology of acute phase proteins. In: Acute phase proteins in the diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a slide lecture kit. **New York, Pfizer**, v.52, n.6, p.552-566, 1994.

SLEDGE, C.B.; HARI REDDI, A.; WALSH, D.A. Biology of the normal joint. In: Ruddy, S.; Harris, E.D.; Sledge, C.B. **Textbook of rheumatology**, ed.6, v.1, Philadelphia, Saunders, 2001.

STASHAK., & BAXTER, G T. **Adams and Stashak's Lameness in Horses**, 6<sup>a</sup> Ed, wiley Blackwell, p.559 - 593, 2011.

STASHAK, T.S. **Adam's lameness in horses**. 5.ed. Philadelphia: Willians & Wilkins, p.341, 2002.

SWAAB, M. E. **Compensatory force plate responses to single or multiple limb lameness induction in horses using a hoof clamp technique...**Tese de Doutorado em Medicina Veterinária - University of Minnesota, Minnesota, 2011.

TIZARD, I.R. **Veterinary immunology: an introduction**. 8.ed. Philadelphia: Elsevier, p.147, 2008.

TURNER, T.A. **Caudal hoof lameness**. In: FLOYD, A.E.; MANSMANN, R.A. Equine podiatry. Saint Louis: Saunders, cap.14, p.294 – 312, 2007.

VANDENPLAS, M.L.; MOORE, J.N.; BARTON, M.H.; ROUSSEL, A.J.; COHEN, N.D. Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses

with colic. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, n.9, p.1509-1516, 2005.

.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, Cambridge University Press, 7ed., cap.10, p.407-410, 2010.

WILSON, A.; WELLER, R. **The Biomechanics of the Equine Limb and Its Effect on Lameness**. In: ROSS, M. W.DYSON, S. **Diagnosis and Management of Lameness in the Horse** Saint Louis: W.B. **Saunders**, cap.26, p.270 - 281, 2011.

# CAPÍTULO I: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE LIDOCAÍNA E BUPIVACAÍNA NA RESPOSTA DE FASE AGUDA NO LÍQUIDO SINOVIAL DE EQUINOS

## 1. INTRODUÇÃO

A anestesia intra-articular é um procedimento rotineiro na clínica de equinos, recomendado quando estruturas sinoviais e articulares são suspeitos de estarem envolvidas no quadro da claudicação (STASHAK, 2002). No entanto, existe uma crescente preocupação com o potencial citotóxico dos anestésicos locais e seus efeitos em longo prazo sobre o tecido articular. Propriedades condrotóxicas dos anestésicos locais têm sido relatadas em humanos e, também, em animais (ANDERSON et al., 2010; FARKAS et al., 2010; HENNIG et al., 2010; PIAT et al., 2012; MARTÍNEZ et al., 2017). Estudos de cultivos de condrócitos *in vitro* demonstraram que os anestésicos locais podem impedir o metabolismo dos condrócitos, acarretando apoptose e necrose destas células e, conseqüentemente, prejudicando a homeostasia da articulação (PARK et al., 2011). No entanto, a influência sobre os efeitos colaterais em dose única e a interação dos fármacos no ambiente articular ainda é controversa.

Nesse sentido, a avaliação do líquido sinovial em equinos é um excelente parâmetro quando se deseja verificar a presença de lesões articulares *in vivo* (STASHAK 2002). Distúrbios articulares induzem a síntese de proteínas de fase aguda (GRUYS et al., 2005). Tais proteínas são atualmente objeto de grande interesse na medicina, pois possuem características específicas, podendo ser utilizadas como biomarcadores do processo inflamatório, sinalizadoras de doenças e, também, determinam diagnósticos e prognósticos (ECKERSALL e BELL, 2010). Sendo assim, pretende-se neste estudo, avaliar e comparar os efeitos da administração intra-articular de lidocaína e bupivacaína através da mensuração das proteínas de fase aguda sinoviais e séricas em equinos hígidos. Os achados poderão, ainda, auxiliar na elaboração de protocolos anestésicos interarticulares menos lesivos para as articulações equinas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COMISSÃO DE ÉTICA

O delineamento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, conforme protocolo nº 286038.

### 2.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

As etapas experimentais foram conduzidas em quatro diferentes propriedades rurais localizadas na região Norte Fluminense, RJ. O processamento das amostras de sangue e de líquido sinovial foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ. A mensuração das proteínas de fase aguda foi realizada junto ao Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal de Viçosa, UFV, MG.

### 2.3 AMOSTRAGEM

Foram utilizados 20 equinos, sendo 16 fêmeas e 04 machos, sem raça definida, com média de idade de  $10 \pm 3,9$  anos e peso médio de  $450 \pm 80$  kg. Os animais foram selecionados com base na inexistência de doença sistêmica e músculo esquelético, ausência de claudicação e quaisquer alterações ou dor evidenciadas à palpação e exame do sistema locomotor. Os animais não realizavam nenhuma atividade física regular, apenas atividades reprodutivas. Uma semana antes do experimento foi realizado controle de endoparasitas (mebendazol,  $50\text{mg kg}^{-1}$ ) e de ectoparasitas (deltametrina a 0,025%), bem como um hemograma com o objetivo de atestar a sanidade geral dos animais.

## 2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram instituídos, aleatoriamente, dois grupos experimentais, Grupo LID, que recebeu a administração intra-articular de 5mL de lidocaína 2% sem vasoconstritor e o Grupo BUP, que recebeu 5mL via intra-articular de bupivacaína 0,5% sem vasoconstritor. A articulação selecionada para o experimento foi articulação radiocárpica. Cada grupo teve seu controle representado pela articulação radiocárpica contralateral, na qual, foi administrado 5mL de solução salina 0,9% (NaCl 0,9%) (Figura 1).

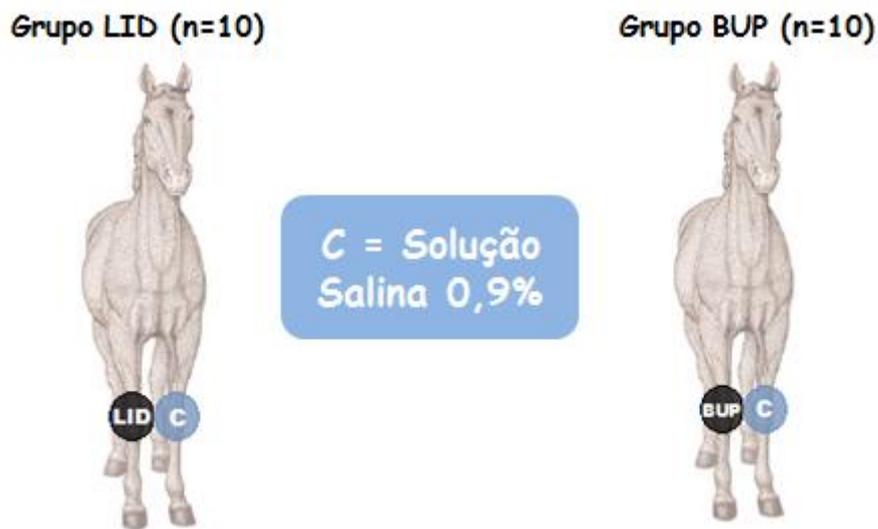


Figura 1. Ilustração demonstrando divisão dos grupos experimentais. Grupo LID = articulação radiocárpica direita infiltração de 5mL de lidocaína 2%, articulação radiocárpica esquerda infiltração de 5mL solução salina 0,9%; Grupo BUP = articulação radiocárpica direita infiltração de 5mL de bupivacaína 0,5%, articulação radiocárpica esquerda infiltração de 5mL solução salina 0,9%.

## 2.5 OBTENÇÃO DO LÍQUIDO SINOVIAL E SANGUE TOTAL

Foram coletadas amostras de líquido sinovial através da artrocentese da articulação radiocárpica. O acesso escolhido foi nos espaços intercárpicos laterais e mediais, segundo técnica descrita por STASHAK (2002). Após tricotomia da articulação em estudo, procedeu-se antissepsia minuciosa, utilizando clorexidina e iodo povidona, aguardaram-se sete minutos de contato com a pele e aplicou-se

álcool a 70% até não existir vestígios de espuma. A artrocentese foi realizada imediatamente após a antissepsia com os animais em posição quadrupedal. Os animais foram contidos de forma mecânica. Utilizando-se agulha hipodérmica 30 x 8, seringas plásticas descartáveis de 10 mL e luvas estéreis realizaram-se as artrocenteses (Figura 2). O acesso foi confirmado verificando-se a presença de líquido sinovial no canhão da agulha. O volume de líquido sinovial colhido de cada articulação foi de 02 mL. Após cada coleta as amostras de LS foram imediatamente centrifugadas<sup>1</sup> com aceleração de 402,4 g, durante 10 minutos, o sobrenadante foi acondicionado em tubos Eppendorfs estéreis e congeladas a - 20°C, até o momento das análises.



Figura 2 Artrocentese sendo realizada na articulação radiocárpica direita de equino.

As amostras de sangue venoso foram obtidas mediante punção da jugular, com prévia antissepsia, executada através de seringas plásticas descartáveis de 10 ml e agulha 25 x 8mm. Para obtenção de soro, o sangue foi colhido em tubo com gel separador. Ato contínuo, as amostras foram centrifugadas com aceleração de 402,4 g, por 10 minutos e o soro resultante, aspirado e acondicionado em Eppendorfs identificados e armazenados a -20°C até o momento das determinações.

---

<sup>1</sup> Centrifuga modelo RDE B-40. RDE Equipamentos Científicos LTDA.

## 2.6 MOMENTOS DE COLETA

As coletas foram realizadas em seis diferentes momentos (Figura 3). O momento T0 iniciou com artrocentese da articulação radiocárpica direita acompanhado da infusão do anestésico local (lidocaína ou bupivacaína), logo em seguida, o mesmo procedimento foi realizado na articulação contralateral controle, porém, com solução NaCl. Concomitante às artrocenteses, amostras de sangue total foram coletadas de todos os animais.

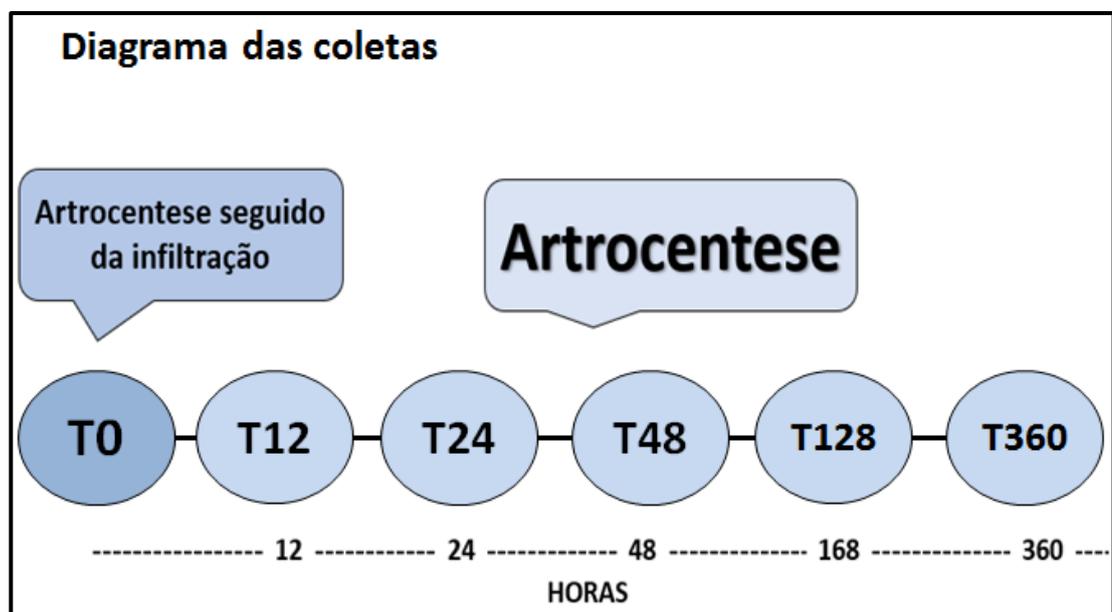


Figura 3. Diagrama das coletas

## 2.7 ANÁLISES LABORATORIAIS E FRACIONAMENTO ELETROFORÉTICO

As proteínas totais séricas e sinoviais foram determinados por aparelho de leitura espectrofotométrica, utilizando-se reagentes específicos (Labmax pleno - Labtest).

Os proteinogramas séricos e sinoviais foram realizados em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio conforme técnica descrita por Laemmli, (1970) modificada. A corrida foi realizada no sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI - VERTICAL ELETROPHORESIS CELLS® BIO-RAD). Utilizou-se o gel de empilhamento a 4% e o gel de separação a 10%. Para o preparo das amostras e fracionamento das proteínas, foram adicionados 10L de soro sanguíneo

ou líquido sinovial diluídos em 30µL de tampão-fosfato (PBS) e 20µL de tampão de amostra posteriormente aquecidos em água em ebulição por 10 minutos. Para o preparo do marcador de peso molecular, foi adicionando 3µL do marcador de peso molecular (Broad Range, Bio-Rad® 6,5 – 200KD), juntamente com 27µL de tampão de amostra. O preparado foi centrifugado em rotação de 402,4 g. Uma alíquota de 10µL de cada preparado foi depositada em uma determinada cavidade do gel, além da amostra de soro controle e o padrão de peso molecular como referência, colocada em cavidades pré-estabelecidas em cada gel. O conjunto da cuba foi submetido à corrente elétrica inicial de 100V. Após 1 hora (as amostras do gel já migraram para o gel de separação), a corrente elétrica foi aumentada em 50% do valor inicial (150V), e após mais 1 hora foi aumentada para 200 V, permanecendo, assim, até o término da corrida. Terminada a corrida, o gel foi retirado da placa e corado durante 30 minutos em solução de azul de Coomassie®R-250 0,2% sob agitação horizontal constante para uma coloração uniforme e, em seguida, submerso em solução descorante a base de metanol e ácido acético para retirar excesso de corante até obtenção da nitidez das bandas proteicas no gel. Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (LabImage 1D, Loccus®), a partir do escaneamento das bandas nos géis. Para o cálculo do peso molecular foram utilizados marcadores de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24 e 20 kDa, além de um soro controle espécie específico cujas proteínas presentes foram previamente identificadas por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF).

A identificação das proteínas foi confirmada com o Software BioTools versão 3.2 (Bruker Daltonics) e Mascot Daemon (Matriz Science, Londres, Reino Unido) contra a base de dados de proteínas para a família de equídeos obtida do banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org>).

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas consistiram na obtenção das médias e erros-padrão para cada grupo e momento. Para verificação da influência dos grupos e dos momentos nas concentrações de cada proteína, foi utilizada a análise de variância e o teste post-hoc de Tukey. O aplicativo estatístico utilizado foi o Sistema para

Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1), sendo adotado o nível de 5% de significância. Foram obtidos os coeficientes de correlação de Pearson entre as concentrações nos grupos, sendo adotado o nível de 5% de significância.

### 3. RESULTADOS

Por meio da eletroforese foi possível identificar a presença de 13 a 23 frações proteicas no soro dos animais avaliados, cujos pesos moleculares variaram de 20 a 243kDa. Dentre as proteínas encontradas, 10 foram consideradas como proteínas de fase aguda e 08 de importância para o estudo em questão, sendo identificadas nominalmente como: Ceruloplasmina (Cp) 158,98 kDa, Transferrina (Tr) 89,68 kDa, Albumina (Abl) 66,20 kDa,  $\alpha$ 1-antitripsina (AAT) 62,09 kDa, imunoglobulina G de cadeia pesada (IgG Pesado) 57,80 kDa, Haptoglobulina (Hp) 47,63 kDa,  $\alpha$ 1-Glicoproteína ácida (AGP) 44,47 kDa e imunoglobulina G de cadeia leve (IgG Leve) 28,95 kDa.

No líquido sinovial, a eletroforese possibilitou a identificação de 11 a 24 proteínas, com peso molecular variou entre 14,79 a 276 a kDa. As proteínas de fase aguda identificadas no líquido sinovial foram às mesmas encontradas no sangue. A estatística descritiva com as médias e erro padrão de cada proteína sérica e sinovial ao longo dos momentos estão demonstrados nas tabelas 1, 2, 3 e 4. Na Tabela 5 está expressa a correlação de Pearson entre os diferentes grupos.

Não houve diferença ( $p>0.05$ ) na resposta de fase aguda sérica e sinovial em função dos tratamentos (LID e BUP), bem como na comparação com as articulações contralaterais controle. Entretanto, foi possível observar diferença ( $p\leq 0.05$ ) nas respostas de fase aguda no decorrer dos momentos de avaliação quando se avaliou a cinética dessas proteínas individualmente, comparando-as com o T0 (valor basal) de cada grupo.

Não foram observadas alterações nos valores de proteína total sérica em função das infiltrações articulares. No T24, verificou-se aumento nos valores de proteína total no líquido sinovial dos animais dos grupos LID e BUP. Alteração semelhante foi observada no T24 nas articulações que receberam NaCl (Figura 4).

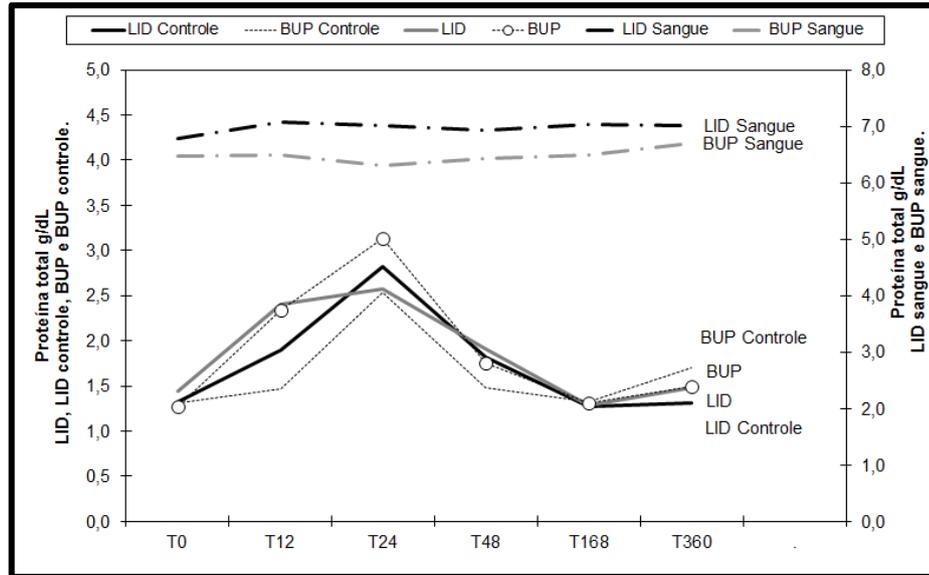


Figura 4. Média das proteínas totais no líquido sinovial e no sangue total (g/dL) de acordo com os períodos observados.

Houve aumento na concentração sérica de ceruloplasmina nos animais do grupo LID no T48. Neste mesmo momento, observou-se uma diminuição (56,08%) nos valores de ceruloplasmina no líquido sinovial destes animais do grupo. Essa redução persistiu até o momento T168 horas (52,55%). Na articulação contralateral controle também houve uma diminuição nos valores de ceruloplasmina nos T48 horas (47,58%) e no T168 horas (55,00%). Não houve alteração nos valores de ceruloplasmina nos animais do grupo BUP (Figura 5).

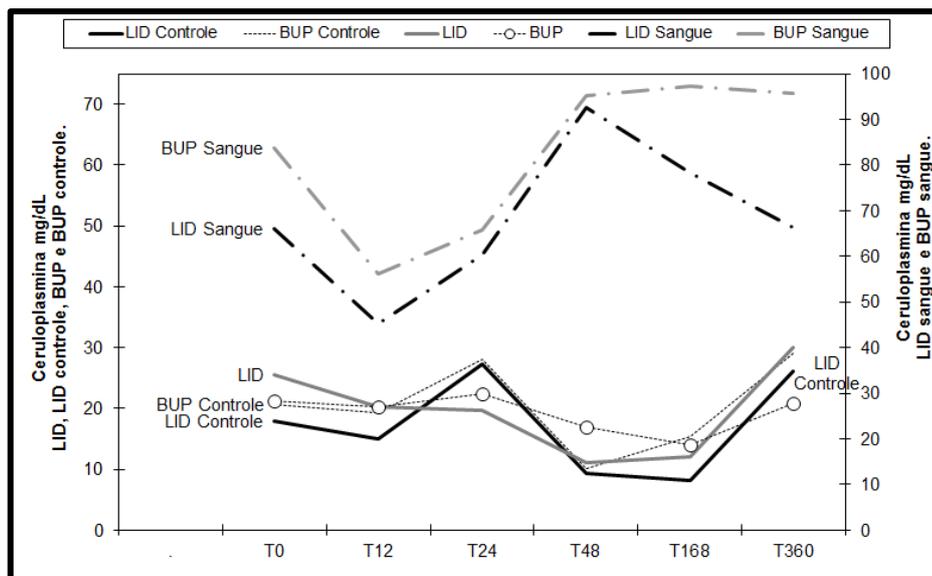


Figura 5. Média das ceruloplasminas no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados.

No T360 horas após a infiltração intra-articular de lidocaína, houve um aumento nos valores séricos de transferrina. Nenhuma alteração nos valores séricos de transferrina foi verificada nos animais do grupo BUP.

Na análise do líquido sinovial, ocorre uma diminuição na concentração de transferrina nos animais do grupo LID no T168 horas. Achados similares foram verificados entre os animais do grupo BUP no T48 horas e no T168 horas. Nas articulações infiltradas com NaCl não foi verificada alteração (Figura 6).

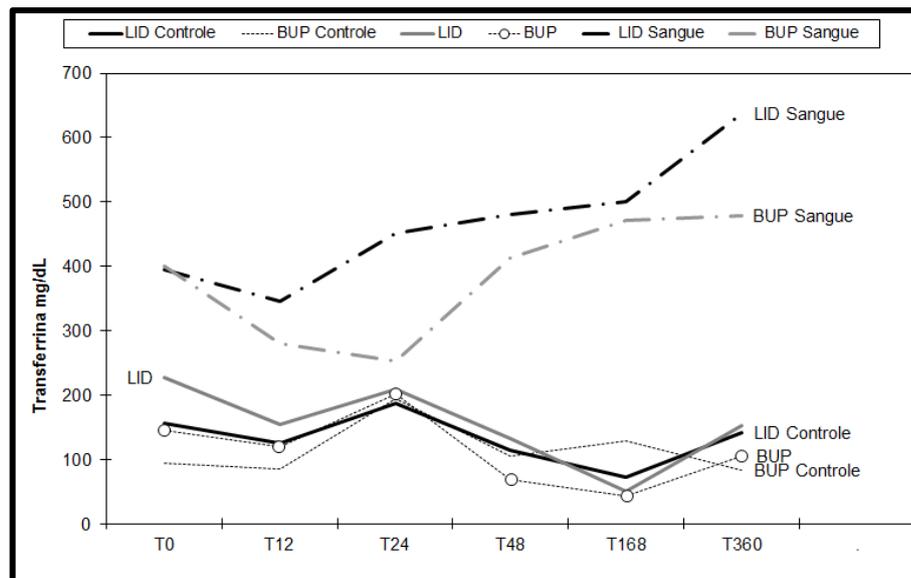


Figura 6. Média de transferrina no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados.

Não houve alteração nos valores séricos de albumina após as infiltrações em ambos os grupos LID e BUP. No LS nos animais do grupo LID houve redução nos valores de albumina nos T48, T169 e T360 horas. Na articulação controle contralateral dos animais do grupo LID, não houve alteração nos valores de albumina ao longo do período experimental. Nos animais do grupo BUP, houve aumento no T24 horas. Na articulação controle contralateral do grupo BUP também foi observado aumento no T24 horas (120,67%) (Figura 7).

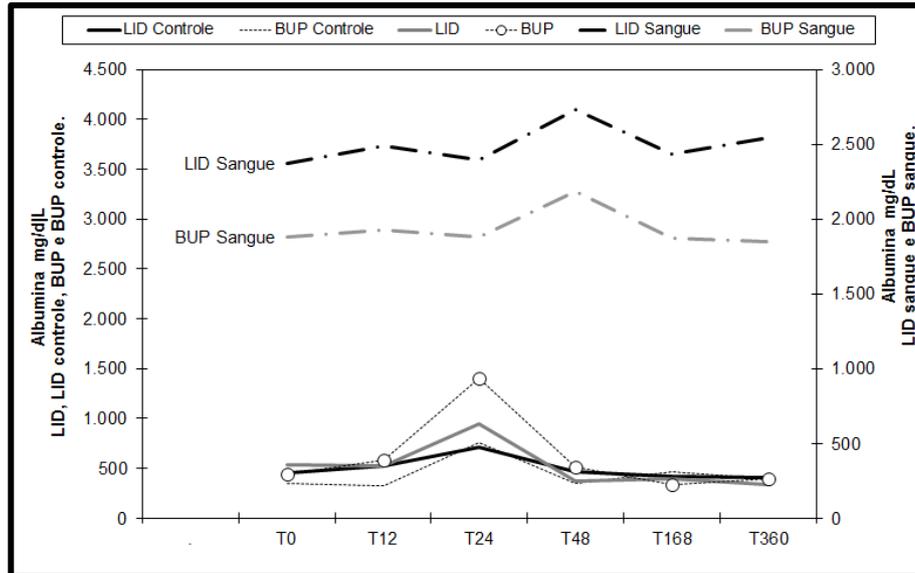


Figura 7. Média de albumina no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados

Verificou-se diminuição na concentração sérica de alfa 1 antitripsina no grupo BUP no T12 horas. Nos animais do grupo LID não foi observado diferença nos valores de alfa 1 antitripsina. No líquido sinovial, verificou-se que no grupo LID ocorreu uma diminuição nos valores de AAT no T12 (42,69%), T48 (49,46%) e no T360 (67,90%). Nos animais do grupo da BUP houve diminuição também nos valores de AAT, porém, apenas no T360. Nas articulações contralaterais-controle foi observado um aumento de AAT no T12 no grupo LID (83,17%) e no T12 também no grupo BUP (85,49%) (Figura 8).

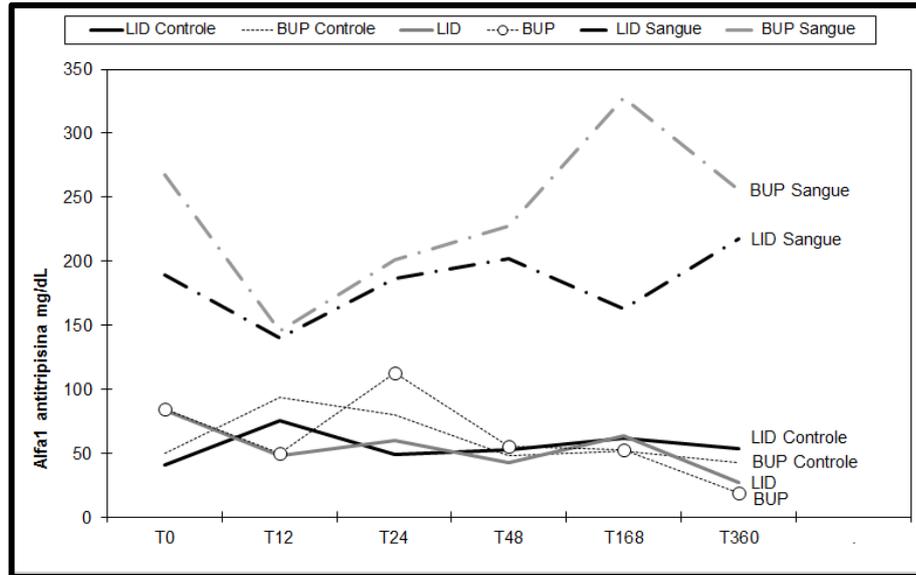


Figura 8. Média de alfa1 antitripsina no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados.

Os valores séricos de IgG cadeia pesada também não apresentaram diferença estatística nos grupos LID e BUP. No líquido sinovial, observou-se uma diminuição nos animais do grupo LID no T360. Nos animais do grupo BUP foi observado um aumento no T24. Nas articulações contralateral-controle que receberam solução salina não apresentou diferença (Figura 9).

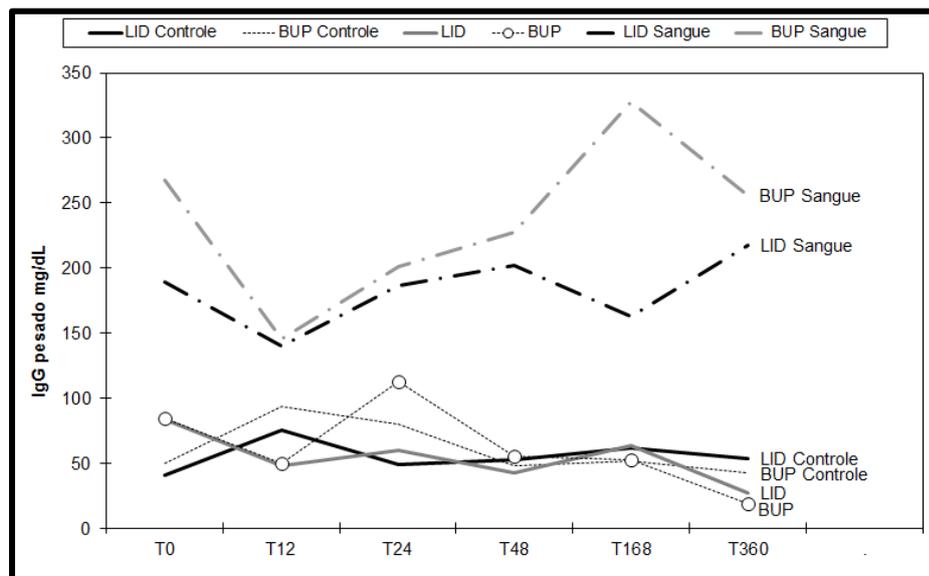


Figura 9. Média de IgG cadeia pesada no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados.

Não foi observada alteração nos valores séricos de haptoglobina no decorrer dos momentos em ambos os grupos. No líquido sinovial verificou-se aumento na concentração de Hp nos animais do grupo LID no T12. Na articulação contralateral dos animais do grupo LID verificou-se uma redução nos valores de Hp no T168 horas. A infiltração de bupivacaína não ocasionou alterações nos valores de Hp sinoviais ao longo do ensaio. Entretanto, na articulação contralateral (NaCl) do grupo BUP observou-se aumento na concentração de Hp no T360 horas (Figura 10).

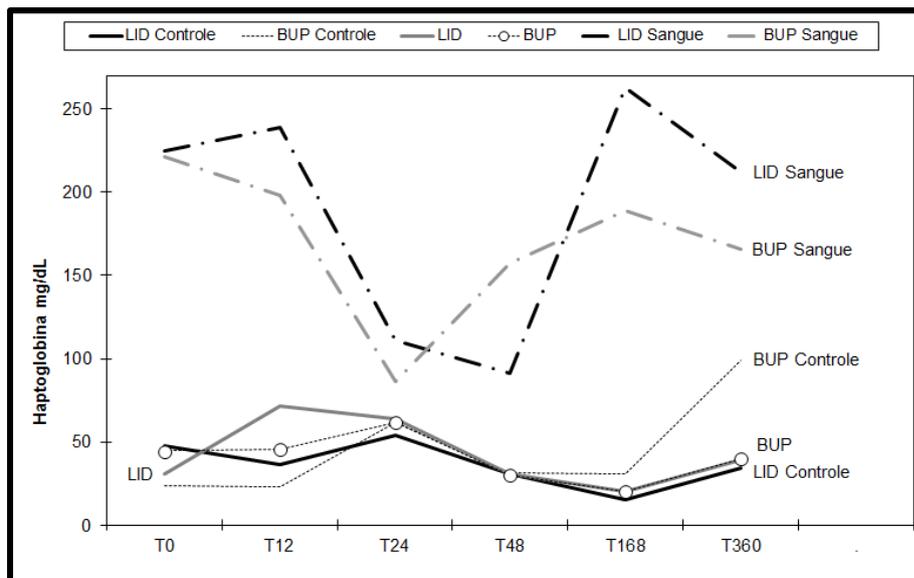


Figura 10. Média de haptoglobina no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados.

Houve aumento na concentração sinovial de glicoproteína ácida no grupo LID no T12. Nos animais do grupo BUP não foi observado alteração nos valores de AGP. Nas articulações contralaterais infiltradas com NaCl não foram observadas alterações ao longo do período experimental (Figura 11).

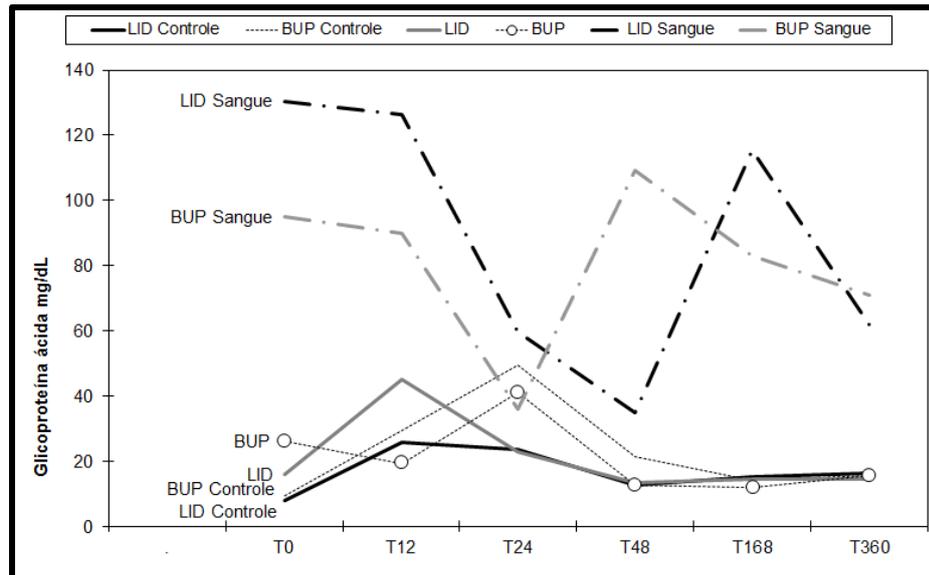


Figura 11. Média de glicoproteína ácida no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados.

Também não foi observado alterações séricas nos valores de IgG de cadeia leve. No líquido sinovial houve aumento na concentração de IgG de cadeia leve. Nos animais do grupo LID no T12 (64,4%), enquanto na articulação contralateral-controle, não houve alteração. Entre os animais do grupo BUP foi observado uma diminuição nos valores de IGG cadeia leve no T128 horas. Na articulação contralateral-controle dos animais do grupo BUP, houve aumento no T24 horas (Figura 12).

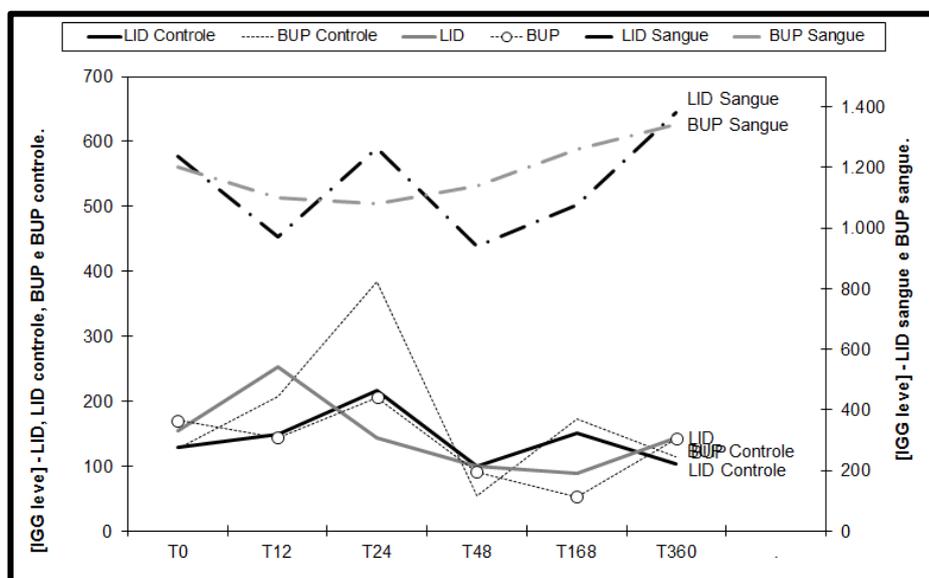


Figura 12. Média de IgG de cadeia leve no líquido sinovial e no sangue total (mg/dL) de acordo com os períodos observados

## ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE AS ARTICULAÇÕES

Por meio do coeficiente de Pearson, não foi observado correlação entre as proteínas de fase aguda sérica e sinovial. Foi observada uma correlação positiva na resposta de fase aguda entre as articulações LID e BUP com suas respectivas articulações contralaterais-controle. A glicoproteína ácida foi a PAF que apresentou maior coeficiente de correlação 0,45 no grupo LID e 0,46 no grupo BUP (Tabela 4).

Tabela 1 Média e erro padrão de proteína total, ceruloplasmina, transferrina e albumina, presentes no líquido sinovial e no sangue, para cada grupo e sua articulação contralateral-controle (NaCl 0.9%).

PROTEÍNA TOTAL (g/dL)						
Tempo (horas)	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE
	Lidocaína 2%	NaCl 0.9%		Bupivacaína 0.5%	NaCl 0.9%	
0	1.45±0.34ABb	1.32±0.07Ab	6.77±0.17Aa	1.27±0.07Bb	1.31±0.09Bb	6.46±0.15Aa
12	2.41±0.45ABb	1.90±0.33Ab	7.07±0.08Aa	2.34±0.49ABb	1.47±0.18Bb	6.49±0.13Aa
24	2.57±0.37Ab	2.82±0.39Ab	7.02±0.19Aa	3.14±0.48Ab	2.53±0.32Ab	6.31±0.32Aa
48	1.92±0.18ABb	1.82±0.20Ab	6.93±0.10Aa	1.76±0.17Bb	1.48±0.16Bb	6.42±0.11Aa
168	1.29±0.08Bc	1.28±0.09Ac	7.03±0.11Aa	1.31±0.12Bc	1.32±0.14Bc	6.49±0.14Ab
360	1.48±0.16ABb	1.31±0.13Ab	7.00±0.23Aa	1.49±0.11Bb	1.71±0.15Bb	6.70±0.18Aa

CERULOPLASMINA (mg/dL)						
Tempo (horas)	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE
	Lidocaína 2%	NaCl 0.9%		Bupivacaína 0.5%	NaCl 0.9%	
0	25,5±5,2Ab	18.0±1.2Bb	66.2±5.4Ba	21.2±1.8Ab	20.6±3.6Ab	83.8±11.5Aa
12	20,3±1,8ABb	15.0±2.0Bb	45.4±6.9Ba	20.2±2.8Ab	19.3±4.5Ab	56.1±5.1Aa
24	19,7±3,3ABb	27.4±4.2Ab	60.4±5.0Ba	22.4±2.9Ab	28.2±2.6Ab	65.7±7.9Aa
48	11,2±1,6Bb	9.4±1.0Cb	92.7±12.4Aa	17.0±1.4Ab	10.2±0.9Ab	95.2±11.6Aa
168	12,1±1,2Bc	8.1±1.2Cc	78.3±6.8ABb	14.1±1.5Ac	15.4±1.9Ac	97.2±6.7Aa
360	30,1±3,0Abc	26.1±3.4Abc	66.4±6.2ABab	20.9±1.4Ac	29.1±17.6Abc	95.6±12.4Aa

TRANSFERRINA (mg/dL)						
Tempos (Horas)	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE
	Lidocaína 2%	NaCl 0.9%		Bupivacaína 0.5%	NaCl 0.9%	
0	228.2±47.8Ab	156.8±16.7Ab	395.0±19.8BCa	146.3±23.6ABb	94.6±11.4Bb	401.2±41.7Aba
12	154.5±5.8Abc	125.7±11.2Ac	346.1±55.2Ca	120.0±10.8Bcc	85.0±11.9Bc	280.1±31.8Bab
24	209.0±31.4Ab	187.6±18.5Ab	451.2±31.1ABCa	202.7±15.7Ab	194.1±19.9Ab	252.8±25.9Bb
48	131.8±13.9ABb	114.8±13.7Ab	481.2±52.9ABa	69.5±6.8CDb	105.2±14.5Bb	412.8±41.0Aba
168	50.9±4.6Bb	73.0±5.9Ab	499.9±27.2ABa	44.1±2.3Db	128.8±14.9Bb	472.1±44.2Aa
360	151.8±10.5Ac	142.6±11.5Ac	636.6±51.3Aa	105.5±12.1BCDc	83.1±5.8Bc	478.3±16.8Ab

ALBUMINA (mg/dL)						
Tempos (Horas)	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE
	Lidocaína 2%	NaCl 0.9%		Bupivacaína 0.5%	NaCl 0.9%	
0	534.0±87.6Abc	452.4±53.0Ac	2368.0±70.7Aa	443.7±58.3Bc	344.4±57.9Bc	1881.9±135.4Ab
12	530.0±97.5Bc	525.0±56.5Ac	2488.0±58.2Aa	578.6±94.9Bc	330.0±34.8Bc	1926.0±147.3Ab
24	950.0±161.5Acd	713.3±136.3Ad	2396.0±68.8Aa	1405.6±107.2Abc	760.0±171.4Ad	1883.1±148.1Aab
48	367.5±69.3Ba	462.5±71.2Aa	4732.0±2371.7Aa	508.8±54.9Ba	351.3±50.2Ba	2183.3±345.8Aa
168	392.2±49.4Bc	417.8±64.4Ac	2434.9±66.5Aa	343.3±53.1Bc	466.7±64.4ABc	1874.4±192.1Ab
360	337.8±45.7Bc	403.3±52.0Ac	2544.9±61.8Aa	393.8±46.8Bc	393.8±59.6ABc	1850.9±115.2Ab

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre os tempos (teste de Tukey em  $P < 0,05$ ); Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente entre os tratamentos (teste de Tukey em  $P < 0,05$ ).

Tabela 2. Média e erro padrão de  $\alpha$ 1-antitripsina, IgG de cadeia pesada, haptoglobulina, (mg/dL) presentes no líquido sinovial e no sangue, para cada grupo e sua articulação contralateral-controle (NaCl 0.9%).

A1 – ANTITRIPSINA (mg/dL)						
Tempos (Horas)	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE
	Lidocaína 2%	NaCl 0.9%		Bupivacaína 0.5%	NaCl 0.9%	
0	84.1±16.4Ac	40.9±3.1Bc	189.5±22.7Ab	84.6±7.9ABc	50.3±6.8Cc	268.1±33.2Aa
12	48.2±5.4BCc	75.0±11.9Ac	140.3±12.2Aab	50.4±7.8BCc	93.3±14.8Bbc	145.9±14.2Ba
24	60.0±6.8ABb	48.6±6.5Bb	186.2±23.9Aa	112.4±18.7Ab	80.1±7.3BCb	201.0±24.7ABa
48	42.5±3.5BCb	52.2±6.9Bb	201.8±28.7Aa	55.4±5.5BCb	47.9±6.0Cb	227.6±23.1ABa
168	63.7±7.1ABb	61.7±9.6ABb	162.7±12.4Aab	52.8±7.4BCb	152.1±10.5Aab	327.7±108.9ABa
360	27.0±2.4Cb	53.2±2.8ABb	217.8±25.3Aa	18.9±2.1Cb	43.1±6.3Cb	255.7±31.0Aa

IGG DE CADEIA PESADA (mg/dL)						
Tempos (Horas)	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE
	Lidocaína 2%	NaCl 0.9%		Bupivacaína 0.5%	NaCl 0.9%	
0	259.6±39.0Ab	225.7±25.9Ab	1183.9±61.4ABa	179.9±23.1BCDb	188.6±24.0Bb	1205.0±97.9Aa
12	260.7±17.7Ab	216.7±23.1Ab	960.0±93.4ABa	256.1±18.6Bb	195.8±22.4Bb	1011.4±101.5Aa
24	264.3±31.6Ac	314.6±34.4Ac	828.2±62.8Bb	378.0±47.5Ac	454.4±47.3Ac	1180.7±86.0Aa
48	219.1±25.1ABc	192.2±23.7Ac	963.8±80.0ABb	216.4±17.5BCc	181.1±15.7Bc	1319.6±64.8Aa
168	185.1±13.9ABb	141.4±9.0Ab	1103.9±62.4Aa	118.4±10.4Db	188.9±26.0Bb	1196.6±115.7Aa
360	145.8±8.1Bb	159.0±22.9Ab	1219.3±63.7Aa	139.1±6.6CDB	199.3±31.7Bb	1223.1±83.7Aa

HAPTOGLOBULINA (mg/dL)						
Tempos (Horas)	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE
	Lidocaína 2%	NaCl 0.9%		Bupivacaína 0.5%	NaCl 0.9%	
0	31,0±7,7BCb	47.5±8.5Ab	224.4±19.9ABa	44,5±4,4ABCb	23.9±5.1Bb	221,2±24,4Aa
12	71,6±4,6Ab	36.4±7.8ABb	239.1±38.7ABa	45,7±5,1ABb	23.1±4.4Bb	198,1±29,9Aa
24	63,5±16,6ABab	53.8±7.1Ab	111.0±15.3Ba	61,6±9,2Aab	61.9±13.0ABab	86,3±15,9Aab
48	30,9±5,8Cc	31.0±5.5Abc	91.5±6.4Bb	29,9±2,4BCc	31.4±5.5Bc	157,6±19,4Aa
168	20,2±2,5Cb	15.5±3.2Bb	262.7±27.8Aa	20,4±2,1Cb	30.8±3.0Bb	189,0±37,5Aa
360	38,9±3,9BCc	34.3±4.0Abc	212.0±22.3ABa	40,0±7,6ABCC	99.3±24.7Abc	165,4±19,9Aab

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre os tempos (teste de Tukey em  $P < 0,05$ ); Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente entre os tratamentos (teste de Tukey em  $P < 0,05$ ).

Tabela 3. Média e erro padrão de glicoproteína ácida, IgG leve (mg/dL) presentes no líquido sinovial e no sangue, para cada grupo e sua articulação contralateral-controle (NaCl 0.9%).

GLICOPROTEÍNA ÁCIDA (mg/dL)						
Tempos (Horas)	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE
	Lidocaína 2%	NaCl 0.9%		Bupivacaína 0.5%	NaCl 0.9%	
0	16.0±2.5Bb	8.1±0.7Ab	130.5±12.2ABa	26.2±3.6ABb	9.6±1.6Bb	95.0±16.5Aa
12	45.0±5.5Ab	25.9±5.5Ab	126.5±35.0ABCa	19.4±3.4Bb	29.4±8.2ABab	90.0±14.4ABab
24	22.9±4.5Bb	23.5±4.4Ab	59.8±7.3BCa	41.2±6.0Aab	49.6±8.0Aab	35.9±5.9Bab
48	13.5±2.8Bb	12.7±2.2Ab	34.7±6.6Cb	12.6±1.3Bb	21.3±2.9Bb	109.1±23.9Aa
168	14.5±1.6Bc	15.2±2.2Ac	115.5±8.8Aa	11.8±0.9Bc	14.3±1.8Bc	82.8±8.2ABb
360	14.5±2.2Bb	16.4±3.8Ab	61.9±13.8ABCa	15.8±5.0Bb	15.6±3.6Bb	71.0±12.2Aba

IGG LEVE (mg/dL)						
Tempos (Horas)	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE	LÍQUIDO SINOVIAL		SANGUE
	Lidocaína 2%	NaCl 0.9%		Bupivacaína 0.5%	NaCl 0.9%	
0	154.0±22.1Bb	129.6±36.4ABb	1237.7±61.7Aa	170.5±24.7Ab	127.9±16.6BCb	1200.7±107.1Aa
12	252.7±24.9Ab	148.5±10.6ABb	972.5±55.8Aa	143.2±14.1ABb	207.4±26.3Bb	1100.7±94.0Aa
24	144.0±15.2Bb	215.8±35.1Ab	1263.9±123.7Aa	205.8±24.4Ab	384.4±44.3Ab	1080.4±124.5Aa
48	99.2±14.2Bb	100.3±15.2Bb	940.2±145.1Aa	90.7±10.4BCb	54.2±16.2Cb	1140.9±154.8Aa
168	88.3±14.2Bb	151.2±17.6ABb	1075.9±104.6Aa	51.9±6.6Db	172.8±38.7BCb	1260.0±63.1Aa
360	143.7±13.1Bb	129.6±36.4Bb	1382.0±64.2Aa	141.3±14.3ABb	114.0±29.0BCb	1341.4±74.2Aa

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre os tempos (teste de Tukey em  $P < 0,05$ ); Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente entre os tratamentos (teste de Tukey em  $P < 0,05$ ).

Tabela 4. Coeficiente de Pearson e grau de significância para determinar a correlação entre as articulações controles e as submetidas aos tratamentos, para os dez tipos de proteínas avaliadas.

Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
1C <sup>a</sup> _PT	1T <sup>c</sup> _PT	58	0,30	2,32	0,0121
2C <sup>b</sup> _PT	2T <sup>d</sup> _PT <sup>e</sup>	59	0,32	2,56	0,0066
1C_ALFA2	1T_ALFA2	36	0,26	1,59	0,0602
2C_ALFA2	2T_ALFA <sup>f</sup>	33	0,65	4,71	0,0000
1C_CER	1T_CER	40	0,50	3,55	0,0005
2C_CER	2T_CER <sup>g</sup>	36	0,07	0,42	0,3381
1C_TRAN	1T_TRAN	39	0,61	4,66	0,0000
2C_TRAN	2T_TRAN <sup>h</sup>	33	0,39	2,39	0,0116
1C_ALBUM	1T_ALBUM	43	0,58	4,57	0,0000
2C_ALBUM	2T_ALBUM <sup>i</sup>	45	0,39	2,76	0,0042
1C_ALFA1	1T_ALFA1	36	-0,16	-0,94	0,1769
2C_ALFA1	2T_ALFA1 <sup>j</sup>	38	0,15	0,92	0,1827
1C_IGG_P	1T_IGG_P	42	0,28	1,83	0,0374
2C_IGG_P	2T_IGG_P <sup>k</sup>	34	0,57	3,97	0,0002
1C_HAPT	1T_HAPT	38	-0,05	-0,28	0,3905
2C_HAPT	2T_HAPT <sup>l</sup>	35	0,35	2,16	0,0191
1C_GLIC	1T_GLIC	38	0,45	2,98	0,0025
2C_GLIC	2T_GLIC <sup>m</sup>	29	0,46	2,68	0,0062
1C_IGG_L	1T_IGG_L	41	0,00	0,01	0,4959
2C_IGG_L	2T_IGG_L <sup>n</sup>	32	0,32	1,88	0,0352

<sup>a</sup> Controle 1 – Solução salina 0,9%; <sup>b</sup> Controle 2 - Solução salina 0,9%; <sup>c</sup> Tratamento 1 – Lidocaína 2%; <sup>d</sup> Tratamento 2 – BUPivacaína 0,5%; <sup>e</sup> Proteínas totais; <sup>f</sup> Alfa-2-macroglobulina; <sup>g</sup> Ceuroplasma; <sup>h</sup> Transferrina; <sup>i</sup> Albumina; <sup>j</sup> Alfa-1-glicoproteína ácida;

#### 4. DISCUSSÃO

A artrocentese é um procedimento minimamente invasivo, comumente utilizado em equinos devido à predisposição destes animais a lesões articulares, entretanto muitos veterinários tem receio em realizar este procedimento devido à possibilidade de promover contaminação iatrogênica que provavelmente levaria a um quadro de artrite séptica. Neste estudo foram realizadas 240 artrocenteses e não foi observado efusão articular ou alteração inflamatória e infecciosa local decorrente deste procedimento, demonstrando que esta é uma técnica segura de ser realizada quando se respeita os preceitos de assepsia.

O modelo utilizado neste trabalho permitiu comparar dois diferentes fármacos administrados via intra-articular em um mesmo equino e, os resultados obtidos trouxeram informações sobre os efeitos destes na composição do líquido sinovial. Este mesmo modelo foi utilizado por Hawkins et al. (1993) e por Piat et al. (2012). A alternativa de uso de animais ou de modelos *in vivo* possibilita avaliar dois tratamentos diferentes, simultaneamente, expondo os dois às mesmas condições metabólicas e ambientais, reduzindo a porcentagem de erro experimental. O delineamento deste estudo foi elaborado de acordo com a cinética da resposta de fase aguda de cada proteína, pois se sabe que a síntese dessas proteínas pode ocorrer de forma instantânea ou de forma tardia, e sua meia vida depende do estímulo, podendo permanecer alterada por até 15 dias após pico inicial (CERÓN et al., 2005).

Os valores de proteínas totais encontrados no líquido sinovial estavam dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie equina que é < que 2,5 g /dl (FRISBIE, 2006), exceto no T24 em que foi observado valor de 2,77 g/dl, apesar de não apresentar diferença estatística. O aumento nos valores de Pt observado no decorrer do experimento foi associado ao trauma desencadeado pelas artrocenteses seriadas. Acreditamos que as repetidas injeções tenham causado danos teciduais e inflamação da membrana sinovial contribuindo para os achados de aumento das proteínas sinoviais. Achados semelhantes foram descritos em estudos realizados

por Sanchez Teran et al. (2012, 2014), Lucia et al. (2013) , Francoz et al. (2007), Dykgraaf et al. (2007), Jacobsen et al. (2006) e White et al. (1989) . O aumento nos valores de Pt não foi observado no T48, quando os intervalos entre as coletas aumentou de 12 para 24 horas, corroborando os achados de Lucia et al. (2013), Francoz et al. (2007) e White et al. (1989) que descreveram o pico inflamatório 24 horas após as artrocenteses e na sequência, as proteínas totais sinoviais reduziram progressivamente até atingirem a normalidade. Esse achado foi explicado por White et al. (1989) os quais relataram que a membrana sinovial tem capacidade de se adaptar a centeses repetidas e por isso os valores de Pt regredem após 24 horas. Tais observações mostram que apesar das artrocenteses seriadas promoverem um aumento da Pt, o processo inflamatório induzido pelo procedimento é de baixa magnitude. Acreditamos que em nosso estudo, além do fator físico (artrocentese), a concentração de Pt foi influenciada, também, pela resposta de fase aguda deflagrada pela infiltração das soluções intra-articular.

O traçado eletroforético do líquido sinovial se assemelhou ao fracionamento realizado por Roberta et al. (2013), Di Filippo et al. (2014) e Daneze et al. (2015) exceto pela ausência da  $\alpha$ 1-antitripsina nos trabalhos supracitados. No presente trabalho, a  $\alpha$ 1-antitripsina foi identificada em 92% das amostras de líquido sinovial. A  $\alpha$ 1-antitripsina é uma PFA que apresenta resposta de fase aguda moderada e possui atividade antiprotease, ou seja, tem como principal função neutralizar a atividade de enzimas proteolíticas liberadas por células do sistema imunológico durante o processo inflamatório, minimizando, assim, danos aos tecidos sadios. Elevação na concentração da  $\alpha$ 1-antitripsina foi descrita em equinos acometidos por abdômen agudo (Fagliari e Silva 2002). Apesar disso, esta proteína ainda não possui fins diagnósticos esclarecidos (ECKERSALL, 2008).

Em relação às proteínas de fase aguda contida no líquido sinovial e no sangue, a comparação entre os grupos Lidocaína 2% e Bupivacaína 0,5% e suas respectivas articulações contralaterais controle demonstraram equivalência estatística ( $P > 0,05$ ). Apesar dos grupos não apresentarem diferença significativa, notou-se uma resposta de fase aguda diferente em cada grupo, quando avaliamos os grupos individualmente utilizando o T0 como valor basal. Portanto, em nosso estudo optou-se por utilizar o T0 que serviu como parâmetro de saúde (controle) para comparação com os demais momentos. O grupo LID induziu síntese de Hp,

AGP, Alb e Tr, enquanto o grupo BUP estimulou a síntese de Tr, IgG leve, IgG pesada. Já, as articulações contralaterais que receberam infiltração de solução salina NaCl 0,9% também apresentaram resposta de fase aguda, porém, com aumento apenas na  $\alpha$ 1- antitripsina.

A AGP e Hp são proteínas de fase aguda positiva, ou seja, suas concentrações aumentam diante de estímulos inflamatórios e/ou infecciosos. Aumentos de até 270% foram verificados em condições inflamatórias agudas (JACOBSEN e ANDERSEN, 2007). No grupo LID a Hp aumentou em 130,97% nas 12 primeiras horas e AGP 181,25% no mesmo momento. Acredita-se que a AGP esteja envolvida com os mecanismos de defesa e suprime algumas funções imunes, como a fagocitose pelos neutrófilos, e a produção de linfócitos, através da modulação dos efeitos das interleucinas IL-1, IL-6 e o FNT (TAKASE, 2010). O aumento da AGP mais expressivo no grupo LID pode estar relacionado com agressão à homeostase articular causada pelo anestésico como descrita por Piat et al. (2012) em um estudo no qual utilizaram um modelo experimental semelhante ao desse estudo e, também, observaram resposta inflamatória mais intensa 24 horas após infusão do anestésico. O aumento da AGP também ocorreu nos grupos BUP e controle, porém em menor magnitude que no grupo LID. Esse aumento pode estar relacionado a outras propriedades que esta proteína exerce, a qual auxilia no reparo e cicatrização (CERÓN et al., 2005) e da função carreadora a qual serve como de escolha para carrear os anestésicos locais (DELLO et al., 1988), essas propriedades talvez expliquem o aumento observado nos demais grupos.

Já a Hp é uma PFA que já foi utilizada como marcador biológico no monitoramento de enfermidades articulares em equinos devido ao seu aumento sinovial e sérico ter sido observado rapidamente após lesões articulares (HULTEN et al., 2002; BARRACHINAA et al., 2016). Em equinos com artrite induzida a concentração de Hp sinovial aumentou até 15 dias após infiltração intra-articular de anfotericina B (BARRACHINAA et al., 2016). Neste estudo, os níveis de Hp mantiveram-se aumentado por mais tempo do que o observado em nosso trabalho e esta diferença pode ser devido à magnitude do processo inflamatório que no caso dos anestésicos locais foi inferior, entretanto, o mesmo estudo descreve também que o aumento de Hp foi significativamente maior no LS do que no soro, semelhante ao o que observamos no presente estudo. Neste não houve correlação entre as alterações séricas e as sinoviais com relação aos valores de Hp. Tais achados

podem estar relacionados à síntese local dessas proteínas pelo tecido articular inflamado, como descrito por Rosenkranz et al. (2010), os quais demonstraram a existência da sua produção articular em humanos com artrite idiopática juvenil. Porém, para afirmar esta hipótese são necessários mais estudos em equinos sobre produção articular desta proteína.

As proteínas de fase aguda negativa albumina e transferrina também apresentaram diferença referente ao T0 no grupo LID (albumina 48h=31,18%, 128h=26,97%, 360h=36,75% e transferrina 128h=77,70%). Estas proteínas são mais notáveis em doenças inflamatórias crônicas (ECKERSALL, 2010). As alterações observadas nos valores de albumina e de transferrina neste estudo demonstram que a resposta de fase aguda persistiu por até 15 dias após as aplicações de anestésicos locais. Os achados desse trabalho estão de acordo com os de Ekersall, (2006), os quais observaram alterações na concentração das proteínas negativas entre 48 e 360 horas em equinos. A redução da transferrina está relacionada com uma autodefesa da articulação contra uma contaminação iatrogênica. A transferrina é uma glicoproteína responsável pelo transporte de íons ferro na circulação e nas situações em que o organismo é invadido por microrganismos, ela reduz a disponibilidade de ferro e, portanto, a invasão bacteriana é retardada (TIZARD, 2008), porém, esta relação não condiz com nosso ensaio, por não ter ocorrido contaminação por microrganismos, acreditamos que a diminuição nos valores de transferrina sinovial esteja relacionada à presença de sangue no líquido sinovial devido à ruptura de vasos durante a artrocentese, nesse caso de contaminação por sangue, há um aumento de ferro no líquido sinovial formando o complexo ferro-transferrina que vai captar e carrear o ferro estocando nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea na forma de ferritina e hemosiderina. Após a liberação do ferro, a transferrina retorna à circulação e é reciclada. Neste estudo, os valores de transferrina retornaram para normalidade após 128h corroborando a sua meia-vida que é de oito dias (198h).

A albumina é uma proteína produzida exclusivamente pelo fígado, cerca de 12% a 20% da capacidade de síntese hepática é disponibilizada para a formação desta proteína (DOWEIKO e NOMPLEGGI, 1991; HILL, 1985). Sua síntese é estimulada por hormônios (corticosteroides, esteroides anabólicos e tiroxina) e inibida por citocinas pró-inflamatórias, por esse motivo ela é considerada uma PFA negativa. Dentre as funções da albumina podemos destacar, nesse estudo, seu

papel na manutenção do equilíbrio ácido-base, por ter um pKa em torno de 7,4, confere a ela uma função de tamponamento em situações de acidose metabólica, enquanto que na vigência de alcalose metabólica, ela também exerce função tampão, já que é capaz de liberar seus íons de hidrogênio (DOWEIKO e NOMPLEGGI, 1991). Podemos considerar que esta função também ocorra no LS e tal assertiva adquira grande relevância já que o pH sinovial em condições normais é de 8 (ZAMBRANO et al., 2011), enquanto o pH da lidocaína é 7,4. Logo, acreditamos que a albumina é uma proteína sinovial importante na regulação deste processo de tamponamento do pH sinovial, uma vez que a albumina representa quase 60% das proteínas sinoviais.

Os animais do grupo BUP apresentaram uma resposta de fase aguda mais discreta quando comparada aos animais do grupo LID, sendo observado diferença apenas nas proteínas Tr, IgG leve e IgG pesada. Em articulações saudáveis, a síntese local das imunoglobulinas (IgG leve e IgG pesada) é insignificante, assim como é mínima a transferência das mesmas do sangue para o líquido sinovial devido à barreira hemato-sinovial (SERAKIDES, 2011). Assim sendo, o aumento das imunoglobulinas no líquido sinovial pode ser explicado devido à presença do anestésico no interior da articulação, que se comporta como um corpo estranho até ser absorvido pela circulação sistêmica, visto que no T360 os valores de globulinas estavam próximos ao T0.

Neste ensaio, a solução salina (NaCl 0,9%) administrada intra-articular também estimulou a resposta de fase aguda, porém, de modo diferente dos anestésicos locais. A solução salina provocou uma reação inflamatória aguda com aumento da proteína  $\alpha$ 1- antitripsina não sendo observada nos grupos dos anestésicos. A resposta do grupo controle ocorreu com 12 horas após a infusão da solução salina. Esta proteína, como já foi citado anteriormente, é o componente mais importante entre os “inibidores de proteases”, que é um grupo de proteínas cuja função é a de neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas, durante processo inflamatório agudo. Sua produção está relacionada com injúria tecidual, necrose, inflamação ou infecção. Achados similares foram encontrados por Gabriele et al. (2019) *in vitro* e por Piat et al. (2012) *in vivo*. O mecanismo pelo qual a solução salina altera a homeostasia articular é desconhecido. Mais estudos devem ser realizados para avaliar os efeitos lesivos destas soluções. Entretanto, este é um

resultado importante e deve ser levado em consideração ao se escolher utilizar a solução salina (NaCl 0.9%) como placebo intra-articular.

Apesar de relatos de que os anestésicos locais possam impedir o metabolismo dos condrócitos, acarretando em apoptose e necrose destas células e, conseqüentemente, prejudicar a homeostasia da articulação (PARK et al., 2011), acreditamos que o resultado obtido no presente trabalho se justifica, pois, a resposta inflamatória *in vivo* é atenuada pelos fatores metabólicos e condroprotetores da articulação. Fatores esses, difíceis de serem reproduzidos em laboratório nos estudos *in vitro*. No ambiente articular, o condrócito normal está rodeado pela matriz extracelular. Esta matriz possui uma função de condro-proteção contra agentes mecânicos e químicos. A matriz extracelular diminui a ação condrotóxica dos anestésicos (CHU et al., 2006). Outro fato relevante é a presença do líquido sinovial e seus componentes no ambiente articular, como por exemplo, proteoglicanos que possuem habilidade de retirar os radicais livres e diminuir a liberação de prostaglandinas e, também, as macromoléculas que regulam a homeostase e fazem a manutenção da articulação (GHOSH e GUIDOLIN, 2002). Outra hipótese seria que a dose utilizada dos AL neste estudo, não seria capaz de produzir uma resposta de fase aguda suficiente para ter deflagrado uma diferença entre os grupos. Considerando também que em animais vivos, quando é feita a administração intra-articular ocorre uma diluição dos anestésicos com o líquido sinovial e assim reduz a concentração da droga, uma vez que, as lesões desencadeadas pelos AL dependem da dose e tempo de infusão, assim, esta condição pode ter contribuído para minimizar os efeitos condrotóxicos.

Os achados deste trabalho fornecem novas informações críticas relacionadas às preocupações atuais sobre o uso clínico da lidocaína e bupivacaína intra-articular. Por fim, vale salientar que este estudo avaliou articulações saudáveis e os condrócitos doentes podem ser mais suscetíveis aos efeitos dos agentes citotóxicos.

## 5. CONCLUSÃO

A lidocaína a 2% e a bupivacaína a 0,5%, quando administradas via intra-articular em dose única, estimulam uma resposta de fase aguda caracterizada por alterações nas concentrações sinoviais das proteínas de fase aguda. Entretanto, a administração intra-articular de lidocaína a 2% ou de bupivacaína a 0,5% não desencadeia uma resposta de fase aguda sérica. A solução salina (NaCl 0,9%) também promove um estímulo inflamatório articular, diferente, porém, se comparada aos anestésicos locais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, S.L.; BUCHKO, J.Z.; TAILLON, M.R.; ERNST, M.A. Chondrolysis of the glenohumeral joint after infusion of bupivacaine through an intra-articular pain pump catheter: a report of 18 cases. **Arthroscopy**, v. 26, n.4, p. 61 - 69, 2010.

BARRACHINA, L.; REMACHA, A.R.; SOLER, L.; GARCÍA, N.; ROMERO, A.; VÁZQUEZ, F.J.; VITORIA, A.; ÁLAVA, M.A.; LAMPRAVE, F. e RODELLAR, C. Acute phase protein Haptoglobin as inflammatory marker in sérum and synovial fluid in an equine model of arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.182, p.74-78, 2016.

CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTYNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p.85-99, 2005.

CHU, C.R.; IZZO, N.J.; PAPAS, N.E; FU, F.H. In vitro exposure to 0.5% BUPivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. **Arthroscopy**, v. 22, n. 7, p. 693 – 702, 2006.

DANEZE, E, R.; FACHINI, V.; CARDOSO, J, C, D, M.; MAIA, R, S.; FARIA, J, F.; TOLEDO, C, Z, P.; SOBREIRA, M, F, R. Proteinograma de líquido sinovial e análise histopatológica das articulações metacarpo-falangeanas de muar com osteoartrite desencadeada por deformidade flexural. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.3, p.289-295, 2015.

DELLO, C,P.; BELPAIRE, F, M.; RICK, A. Influence of inflammation on sérum concentration, molecular heterogeneity and drug binding properties of canine alpha-1-acid glycoprotein. **Jounal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.11, n.1, p. 71-76, 1988.

DI FILIPPO, P.; NOGUEIRA, A.; ANAI, L.; ALVES, A.; SANTANA, A.; PEREIRA, G. Perfil eletroforético das proteínas séricas e do líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução experimental do duodeno, íleo e cólon maior. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.4, p.938-946, 2010.

Di Filippo, P. A.; Santos, G. C.; Graça, F. A. S.; Nogueira, A. F. S.; Alves, A. E.; Santana, A. E. Proteinograma do líquido sinovial de equinos hígidos obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Ciência Rural**, v.44, n.7, p.1268-1271, 2014.

DOWEIKO, J.P.; NOMPLEGGI, D.J. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. **JPEN**, v.15, n.2, p. 207- 219, 1991.

DYKGRAAF, S.; DECHANT, J.E.; JOHNS, J.L.; CHRISTOPHER, M.M.; BOLT, D.M.; SNYDER, J.R. Effect of intrathecal amikacin administration and repeated centesis on digital flexor tendon sheath synovial fluid in horses. **Veterinary Surgery**, v. 36, p. 57–63, 2007

ECKERSALL, P, D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias,. In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds), **Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. Academic Press, San Diego**, p. 117- 155, 2008.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23 - 31, 2010.

FAGLIARI, J.J.; PASSIPIERI, M.; OKUDA, H.T.; SILVA, S.L.; SILVA, P. C. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1355-1358, 2007.

FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hígidos e de eqüinos acometidos por abdômem agudo, antes e após laparotomia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.54, n.6, p.559-567, 2002.

FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L.; SILVA, P.C.; PEREIRA, G.T. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo e submetidos à laparotomia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.2, p.322-328, 2008

FARKAS, B.; KVELL, K.; CZÖMPÖLY, T.; ILLÉS, T.; BÁRDOS, T. Increased chondrocyte death after steroid and local anesthetic combination. **Clin Orthop Relat Res**, v. 468, n. 11, p. 3112 – 332, 2010.

FRANCOZ, D.; DESROCHERS, A.; LATOUCHE, J. S. Effect of repeated arthrocentesis and single joint lavage on cytologic evaluation of synovial fluid in 5 young calves, **J Vet Res**, v. 71, n.2, p. 129 –134, 2007.

FRISBIE, D.D.; MORISSET, S.; HO, C.P; RODKEY, W.G.; STEADMAN, J.R.; MCLLWRAITH, C.W. Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. **Am. J. Sports Med**, v. 34, n.11, p.1824- 1831, 2006.

HENNIG, G.S.; HOSGOOD, G.; BUBENIK-ANGAPEN, L.J.; LAUER, S.K.; MORGAN, T.W. Evaluation of chondrocyte death in canine osteochondral explants exposed to a 0.5% solution of bupivacaine. **Am J Vet Res**. V.71, n.8, p. 875-83, 2010.

SILVA, G. B.; DE LA CÔRTE, F. D.; BRASS, K. E.; PALMA, H. E.; GALLIO, M.; CANTARELLI, C.; BERTOLIN, K.; KRAUSE, A.; WERGUTZ, J.; FONTANARI KRAUSE, L. M.; ANTONIAZZI, A. Q.; Viability of equine chondrocytes following exposure to mepivacaine and ropivacaine *in vitro*, **Journal of Equine Veterinary Science**, V. 77, p. 80 – 85, 2019.

GHOSH, P.; GUIDOLIN, D. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? **Semin Arthritis Rheum**, v.32, n.1, p.10-37, 2002.

GRUYS, E., TOUSSAINT, M.J.M., NIEWOLD, T.A., KOOPMANS, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J Zhejiang Univ Sci B, Hangzhou**, v. 6, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

HAWKINS, D. L.; CARGILE, J. L.; MACKAY DO, R. J.; BROOME, T. A.; SKELLEY, L. A.; Effect of tumor necrosis factor antibody on synovial fluid cytokine activities in equine antebrachioacarpal joints injected with endotoxin. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 56, n.10, p.1292 -1299, 1995.

HILL, P.G. The measurement of albumin in serum and plasma. **Ann Clin Biochem**, v.22, p. 565-578, 1985.

HULTEN, C.; GRÖNLUND, U.; HIRVONEN, J.; TULAMO, R. M.; SUOMINEN, M. M.; MARHAUG, G.; FORSBERG, M. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and  $\alpha_2$ - globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.34, n.7, p.699 - 704. 2002.

TAKASE, K.; YUKI, M.; ITOH, H. Serum alpha-1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, p. 65-71, 2010.

ECKERSALL N, S. Review of equine acute-phase proteins. **Annual convention of the american association of equine practitioners (AAEP)** Orlando: University of Florida, v.53, p. 230 – 235, 2007.

JACOBSEN, S.; KJELGAARD-HANSEN, M.; HAGBARD PETERSEN, H.; Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. **Vet J** v.172, p. 315 – 319, 2006.

LUCIA, J. L.; COVERDALE, J. A.; ARNOLD, C. E.; WINSKO, K. N. Influence of an

intra-articular lipopolysaccharide challenge on markers of inflammation and cartilage metabolism in young horses. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 6, p. 2693-2701, 2013.

PAK, J.; SUTRADHAR B.C.; HONG, G.; CHOI, S.H.; KIM, G. Comparison of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine in equine articular chondrocytes. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.38. n.2, p.127–133, 2011.

PIAT, P.; RICHARD, H.; BEAUCHAMP, G.; LAVERTY, S.. Perrine et al. In Vivo Effects of a Single Intra-Articular Injection of 2% lidocaine or 0.5% bupivacaine on Articular Cartilage of Normal Horses. *Vet Surg.* v.41, n.8, p. 1002-1010, 2012.

ROBERTO, S. Z.; FERNANDA, A. F.; JÚLIA, M. M.; GLAÚCIA, M. B. D.; GERALDO, E. S. A.; EDUARDO, M. M. L.; ANDRÉ, R. C. B. V.; ROBERTA, F. G. Aspectos físicoquímicos e citológicos do líquido sinovial da articulação temporomandibular de equinos em diferentes idades. **Pesq. Vet. Bras.** vol.31, n.10, 2011

ROSENKRANZ, M. E.; WILSON, D. C.; MARINOV, A. D.; Synovial fluid proteins differentiate between the subtypes of juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis Rheum**, v.62, n. 23, p.1813, 2010.

RUBIO-MARTÍNEZ, L.M.; RIOJA, E.; CASTRO MARTINS, M.; WIPAWEE, S.; CLEGG, P.; PEFFERS, M.J. Local anaesthetics or their combination with morphine and/or agnesium sulphate are toxic for equine chondrocytes and synoviocytes in vitro. **Veterinary Research**, v.13, n.1, 2017.

SANCHEZ-TERAN, A.F.; BRACAMONTE, J.L.; HENDRICK. S. L.; RIDDELL, K.; MUSIL, B.; HOFF, RUBIO-MARTÍNEZ L.M., Effect of repeated through-and-through joint lavage on serum amyloid A in synovial fluid from healthy horses, **The Veterinary Journal** 2016.

SANCHEZ TERAN, A.F.; BRACAMONTE, J.; HENDRICK, S.; BURGUESS, H.J.; DUKE-NOVAKOVSKI, T.; SCHOTT, M.; HOFF, B.; RUBIO-MARTINEZ, L.M.

Evaluation of the effect of arthroscopic lavage on serum amyloid A concentration, total protein and nucleated cell count in synovial fluid of healthy horses. **Proceedings of the Surgery Summit of the American College of Veterinary Surgeons, San Diego, CA, USA**, V.45, n.2, p.223-253, 2014.

SANCHEZ TERAN, F.; RUBIO-MARTINEZ, LUIS.; VILLARINO. F.; MACARENA, N. Effects of repeated intra-articular administration of amikacin on serum amyloid A, total protein and nucleated cell count in synovial fluid from healthy horses. **Equine veterinary journal**, v.12, n.6, p.10-11, 2012.

SERAKIDES, R. Ossos e articulações. In: Santos, R. L.; Alessi, A. C. **Patologia veterinária**. São Paulo: Roca, p.647- 696, 2011.

SILVA, G. B.; DE LA CÔRTE, F. D.; BRASS, K. E.; PALMA, H. E.; GALLIO, M.; CANTARELLI, C.; BERTOLIN, K.; KRAUSE A.; WERGUTZ, J.; FONTANARI KRAUSE, L. M.; ANTONIAZZI, A. Q. Viability of Equine Chondrocytes After Exposure to Mepivacaine and Ropivacaine In Vitro. **J Equine Vet Sc**, v.77, p. 80 – 85, 2019.

STASHAK, T.S. **Adam's lameness in horses**. 5.ed. Philadelphia: Willians & Wilkins, p.341, 2002.

TIZARD I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8ª ed. **Roca**, São Paulo. 532p, 2008.

WHITE,K.K.; HODGSON, D.R.; HANCOCK, D.; PARRY, B.W.; CORDELL, C. Changes in equine carpal joint synovial fluid in response to the injection of two local anesthetic agents. **The Cornell veterinarian journal**, v.79, n.1, p. 25 - 38, 1989.

ZAMBRANO, R, S.; FONSECA, F, A.; MORAES, J, M.; DIAS, G, M, B.; ALVES, G, E, S.; LIMA, E, M, M, L.; VIANNA, A, R, C, B.; GODOY, R, F. Aspectos físicoquímicos e citológicos do líquido sinovial da articulação temporomandibular de equinos em diferentes idades. **Pesq. Vet. Bras**, v.31 n.10, 2011.