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

CONDROTOXICIDADE E EFEITOS INFLAMATÓRIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ROPIVACAÍNA EM EQUINOS

TESE DE DOUTORADO

Gabriele Biavaschi Silva

Santa Maria, RS
2019

CONDROTOXICIDADE E EFEITOS INFLAMATÓRIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ROPIVACAÍNA EM EQUINOS

Gabriele Biavaschi Silva

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

Orientador: Prof. PhD. Flávio Desessards De La Corte

Santa Maria, RS
2019

Silva, Gabriele
CONDROTOXICIDADE E EFEITOS INFLAMATÓRIOS IN VITRO E IN VIVO DA ROPIVACAÍNA EM EQUINOS / Gabriele Silva.- 2019.
109 p.; 30 cm

Orientador: Flávio De La Côrte
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2019

1. condrócitos 2. anestésicos locais 3. intra articular 4. gene I. De La Côrte, Flávio II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2019
Todos os direitos autorais reservados a Gabriele Biavaschi Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: **gabibiavaschi@hotmail.com**

Gabriele Biavaschi Silva

CONDROTOXICIDADE E EFEITOS INFLAMATÓRIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ROPIVACAÍNA EM EQUINOS

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

Aprovado em 7 de março de 2019:

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

_____
Alexandre Krause, PhD (UFSM)

_____
Valerio Valdetar Marques Portela Junior, PhD (UFSM)

_____
Luciana Maria Fontanari Krause, PhD (UNIFRA)

_____
Rafael Faleiros, PhD (UFMG)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de cursar os cursos de graduação e pós-graduação em uma instituição de referência, e pelo grandioso apoio estudantil, fundamental para que eu pudesse ter uma boa formação.

À minha família que sempre me apoiou, ouviu, aconselhou e não mediu esforços para me ajudar. Aos meus pais, Patrícia Biavaschi e Joarez da Silva minha eterna gratidão pelo amor, confiança e credibilidade. Aos meus avós Nair Militz da Silva (*in memoriam*), Narciso Silva (*in memoriam*), Féliz Floriano Gonzales Biavaschi e Salete Biavaschi pelo amor incondicional, ensinamentos e valores trasmitidos.

Ao meu orientador Flavio Desessards de La Côrte agradeço a confiança, amizade, aprendizado e apoio para realização deste trabalho.

A professora Karin Erica Brass pelos ensinamentos, o meu muito obrigada pela amizade nestes onze anos de orientação.

Ao meu namorado Diego Rafael Palma da Silva, pelo carinho, apoio, aprendizado, incentivo e força nos momentos em que mais precisei.

Aos professores Alexandre Krause, Luciana Fontanari Krause e Kalyne Bertolin pela orientação e por contribuirem intensamente na execução deste projeto, o aprendizado de novas técnicas foi fundamental para a obtenção dos resultados, obrigada por compartilharem seus conhecimentos.

Aos amigos e colegas do grupo de medicina de equinos, Antônio Alcemar Beck Junior, Grasiela de Bastiani e Stefano Dau pela amizade e pela grande ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao Julien Wergutz pela dedicação na realização dos trabalhos laboratoriais, sem dúvida fio ndamental para a realização deste trabalho.

equipe de estagiários do Professor Flavio Desessards de La Côrte, obrigada pela ajuda na execução deste projeto.

Agradeço todas as dificuldades que eu enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito (Chico Xavier)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

CONDROTOXICIDADE E EFEITOS INFLAMATÓRIOS IN VITRO E IN VIVO DA ROPIVACAÍNA EM EQUINOS

AUTORA: GABRIELE BIAVASCHI SILVA
ORIENTADOR: FLÁVIO DESESSARDS DE LA CORTE
Santa Maria, 07 de março de 2019.

Os anestésicos locais são rotineiramente usados no diagnóstico de claudicações e controle da dor articular em equinos. Contudo, devido à sua potencial toxicidade, devem ser usados com cautela pelo risco de desenvolvimento de doença articular. Estudos prévios em humanos demonstram a ropivacaína como uma alternativa menos tóxica, motivando o interesse no uso deste anestésico pela via intra-articular (IA) em equinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos IA da ropivacaína em técnicas *in vitro* e *in vivo*. Para avaliação de viabilidade, condrócitos em monocamada foram divididos em seis grupos e expostos a 30 minutos dos seguintes tratamentos: meio condrogênico (DMEM), ropivacaína 7.5mg/ml, ropivacaína 10mg/ml, solução salina 0.9%, mepivacaína 20mg/ml e mepivacaína 30mg/ml. A viabilidade dos condrócitos foi avaliada pelos métodos de trypan blue, MTT e citometria de fluxo com fluoróforo iodeto de propídio. Para avaliação de expressão gênica *in vitro* foram utilizados cultivos de condrócitos em pellets submetidos a 30 minutos dos seguintes tratamentos: mepivacaína 20 mg/ml, ropivacaína 10mg/ml e solução salina 0.9%. As células foram avaliadas por Reação em Cadeia Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) para investigar a expressão de *Il1*, *Il6*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Acan* e *Col2a1*. O estudo *in vivo* foi realizado com a administração IA de ropivacaína 10mg/ml e solução salina nas articulações tibiotársicas de oito pôneis. Imediatamente antes da administração dos tratamentos e 24 horas depois foi realizada coleta de líquido sinovial. As amostras foram avaliadas quanto à contagem de células nucleadas, proteína total e qualidade da mucina. Sob anestesia geral, através de portais artroscópicos, foram coletadas amostras de sinóvia, para determinação de concentrações de *Ibl1*, *Il6*, *Mmp9* e *Mmp13*, e cartilagem, para as mesmas determinações mais *Acan* e *Col2a1* por qPCR. A avaliação de viabilidade celular produziu resultados distintos nos diferentes ensaios. No método de trypan blue não houve diferença; o método de MTT demonstrou menor viabilidade de células tratadas com ropivacaína que DMEM. Diferentemente, a citometria de fluxo não evidenciou diferenças entre ropivacaína 7.5mg/ml e DMEM. Em condrócitos cultivados em pellets, a expressão dos genes avaliados foi semelhante nos tratamentos com mepivacaina, ropivacaína e salina. Nos pellets tratados com mepivacaína e ropivacaína houve reduções da expressão de *Il6* e *Mmp13* antes e após o tratamento. Enquanto a exposição à ropivacaína suprimiu os níveis de *Mmp9*, A exposição à mepivacaína resultou em aumento na expressão de *Col2a1*. Os resultados *in vivo* demonstraram que ropivacaína e salina causam inflamação no líquido sinovial, observado pelo aumento de celularidade, quando aplicados via IA. Entretanto, não foram observadas diferenças entre marcadores anabólicos e catabólicos de cartilagem entre tratamentos. Apenas os níveis de *Mmp9* na sinóvia foram aumentados após tratamento com ropivacaína. Os resultados *in vitro* deste trabalho sugerem que a curta exposição à ropivacaína pode resultar em menor taxa de morte celular que a exposição à mepivacaína; adicionalmente, a exposição à ropivacaína não causa perda da homeostase dos condrócitos. Por fim, o estudo *in vivo* revelou similaridade entre os efeitos do tratamento IA da ropivacaína e salina, sugerindo ser este anestésico uma opção segura para o uso IA.

Palavras-chave: Condrócitos. Anestésicos locais. Intra-articular. Gene.

ABSTRACT

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

CONDROTOXICITY AND INFLAMMATORY EFFECTS *IN VITRO* AND *IN VIVO* OF ROPIVACAINE IN EQUINE

AUTHOR: Gabriele Biavaschi Silva
ADVISOR: Flávio Desessards De La Corte
Santa Maria, 07 de março de 2019.

Local anesthetics are routinely used in lameness diagnosis and joint pain control in horses, but because of their potential toxicity, they should be used with caution in order to avoid the development of joint disease. Previous studies in humans demonstrate ropivacaine as a less toxic alternative, motivating interest in the use of this anesthetic by the intra-articular (IA) route in horses. The objective of this study was to evaluate the IA effects of ropivacaine *in vitro* and *in vivo*. For viability evaluation, monolayer chondrocytes were divided into six groups and exposed to 30 minutes of treatment. The groups were: chondrogenic medium (DMEM), ropivacaine 7.5mg/ml, ropivacaine 10mg/ml, saline 0.9%, mepivacaine 20mg/ml and mepivacaine 30mg/ml. Chondrocyte viability was assessed by trypan blue, MTT and flow cytometry methods. To evaluate gene expression *in vitro*, pellets cultures of chondrocytes were used and submitted to 30 minutes of the following treatments: mepivacaine 20mg/ml, ropivacaine 10mg/ml and saline 0.9%. The cells were evaluated by Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) to investigate the expression of *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Acan* and *Col2a1*. The *in vivo* study was performed with the administration of 10 mg/ml ropivacaine and saline in the tibiotarsal joints of eight ponies. Synovial fluid samples were collected before and 24 hours after treatment. Then, samples were evaluated for total nucleated cells count, total protein and mucin precipitate evaluation. After 24 hours, the ponies were anesthetized and samples of synovia and cartilage were collected through arthroscopy to evaluate by qPCR. In the synovia and cartilage samples *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9* and *Mmp13* were evaluated; genes *Acan* and *Col2a1* were also evaluated in the cartilage samples. The evaluation of cell viability produced different results in the different assays: in the trypan blue method there was no difference; the MTT method demonstrated less viability of cells treated with ropivacaine than DMEM. Differently, flow cytometry did not show differences between ropivacaine 7.5mg ml and DMEM. In chondrocytes cultured in pellets, the expression of the evaluated genes was similar in the mepivacaine, ropivacaine and saline treatments. In pellets treated with mepivacaine and ropivacaine there was downregulation of the expression of *Il6* and *Mmp13* before and after treatment. After exposure to ropivacaine, there was downregulation of *Mmp9* levels. In turn, the short exposure of the pellets to mepivacaine caused an increase in *Col2a1* expression. *In vivo* results demonstrated that ropivacaine and saline cause inflammation in the synovial fluid when applied IA. However, no differences were observed between anabolic and cartilage catabolic markers between treatments. Only *Mmp9* levels in synovia were increased following ropivacaine treatment. The *in vitro* results of this study suggest that short exposure to ropivacaine may result in a lower cell death rate than exposure to mepivacaine; in addition, mepivacaine and ropivacaine did not cause unbalance of chondrocyte homeostasis and appear to have some anti-inflammatory effect. Finally, the *in vivo* study revealed similarity between the effects of the IA treatment of ropivacaine and saline, suggesting that this anesthetic is a safe option for IA use.

Keywords: Chondrocytes. Local anesthetics. Intra-articular. Gene.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 12

2.1 Fisiologia das articulações sinoviais 12

2.1.1. Membrana sinovial 12

2.1.2. Líquido sinovial 13

2.1.3. Cartilagem articular 18

2.2. Claudicação em equinos 22

2.3. Anestésicos intra-articulares (IA) 23

2.4. Modulação inflamatória 26

2.5. Avaliação *in vitro* de condrotoxicidade 33

2.6. Avaliação *in vivo* de condrotoxicidade 36

2.7. Avaliação de fatores inflamatórios por qPCR 38

2.8. Biomarcadores 40

3. ARTIGO 1 - VIABILITY OF EQUINE CHONDROCYTES AFTER EXPOSURE TO MEPIVACAINE AND ROPIVACAINE IN VITRO 44

Abstract 45

Introduction 45

Materials and Methods 46

Results 47

Discussion 47

Conclusions 49

References 49

4. ARTIGO 2 - INFLAMMATORY AND TISSUE REMODELING EXPRESSION PROFILE OF EQUINE CHONDROCYTES EXPOSED TO MEPIVACAINE AND ROPIVACAINE 51

Abstract 52

Introduction 52

Materials and Methods **54**
Results **56**
Discussion **57**
Conclusions **60**
References **62**
5. ARTIGO 3 - EFFECTS OF INTRA-ARTICULAR ROPIVACAINE ADMINISTRATION IN HORSES **69**
Abstract **70**
Introduction **71**
Materials and Methods **73**
Results **77**
Discussion **78**
Conclusions **85**
References **88**
6. DISCUSSÃO **96**
7. CONCLUSÕES **99**
8. REFERÊNCIAS **100**

1. INTRODUÇÃO

A alta prevalência de claudicação em cavalos e respectivas perdas econômicas aos proprietários são conhecidas (ROSSDALE et al. 1985). As lesões articulares representam grande parte da casuística nos exames de claudicação e na maioria dos casos, os danos na cartilagem são identificados como fatores contribuintes importantes (ROCHA JUNIOR et al. 2016).

O diagnóstico da claudicação em equinos é feito através do exame clínico, que inclui a utilização de agentes anestésicos locais intra-articulares (IA) que permitem identificar com precisão a origem da dor (SANTOS et al., 2009). Estes anestésicos também fazem parte dos procedimentos analgésicos pós-operatórios (PIAT et al., 2012). Em medicina de equinos a mepivacaína é o fármaco de eleição para o uso intra-articular (IA) (PARK et al., 2011; BOLT et al., 2008; SCHUMACHER et al., 2013; SILVA et al., 2015), contudo a pesquisa por fármacos com menor potencial condrotóxico deve ser estimulada. A ropivacaína, por exemplo, demonstrou menor condrotoxicidade que a mepivacaína em condrócitos humanos (BREU et al, 2013).

Como a perda de condrócitos tem sido implicada no desenvolvimento da osteoartrite (OA), é crucial determinar a extensão da citotoxicidade dos anestésicos locais nos condrócitos (BREU et al., 2013). A baixa capacidade de regeneração da cartilagem e o potencial mitótico limitado dos condrócitos adultos corroboram com a importância da afirmação anterior (ROCHA JUNIOR et al., 2016).

As técnicas de avaliação de cartilagem *in vitro* permitem a manipulação experimental de fatores específicos e isolamento de populações celulares (STEWART et al., 2000). Entretanto, os estudos *in vivo* são mais efetivos em determinar efeitos potenciais efeitos destes compostos em pacientes (PIAT et al., 2012).

Atualmente, o diagnóstico da doença articular em equinos se baseia em exames clínicos e complementares, principalmente radiológico (FRISBIE et al., 2016). As limitações são que, em fases iniciais de OA, mesmo com degeneração de cartilagem a aparência radiológica articular pode ser normal (BRAMA et al., 1998). Nestas situações, o uso de marcadores bioquímicos mensurados em estágios iniciais de degeneração articular podem prover informações úteis aos clínicos para avaliar a integridade da cartilagem antes que mudanças irreversíveis ocorram na articulação (BRAMA et al., 1998; BAUER et al, 2006;

FRISBIE et al., 2016), contudo esses métodos diagnósticos ainda não estão disponíveis aos clínicos.

Visto a importância e as limitações de cada forma de avaliação de integridade dos tecidos da cartilagem, ressalta-se a importância de estudos completos, *in vitro* e *in vivo*, frente à exposição de um anestésico local, que avaliem os efeitos de anestésicos locais por diferentes métodos diagnósticos a fim de permitir um perfil anabólico/catabólico do ambiente articular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiologia das articulações sinoviais

As articulações sinoviais são consideradas órgãos complexos nos quais todos os tecidos constituintes (cartilagem articular, osso subcondral e membrana sinovial) interagem diretamente entre si ou por meio do líquido sinovial (FRISBIE et al., 2016). A homeostase articular é caracterizada pela estabilidade entre os processos anabólicos e catabólicos, que correspondem aos desafios biomecânicos impostos à articulação (VAN WEEREN, 2016).

As evidências *in vitro* e *in vivo* sugerem que as alterações funcionais e estruturais na cartilagem articular estão relacionadas com lesões também em outros tecidos da articulação, indicando que a liberação de proteases com atividade degradativa são responsáveis pelo dano a cartilagem articular (CAMPEBELL et al., 2004). A interação entre a membrana sinovial ou sinóvia e a cartilagem articular é complexa e a secreção de proteases pode ser induzida por diversas citocinas locais, sendo que estes peptídeos solúveis produzidos por uma célula afetam a atividade de outros tipos de células (CAMPEBELL et al., 2004; McILWRAITH, 2016).

2.1.1 Membrana sinovial

A cápsula de tecido fibroso que reveste a maioria das articulações consiste de duas camadas distintas. A camada exterior da cápsula, composta por tecido fibroso relativamente rígido, é fortemente ligada a estruturas extra-articulares, como ligamentos colaterais, e oferece principalmente estabilidade mecânica. Além disso, possui um grande número de terminações nervosas proprioceptivas. A camada mais interna da cápsula, também chamada de sinóvia ou membrana sinovial é formada pelas camadas íntima e sub-íntima. A última é composta por tecido conjuntivo frouxo e é muito bem vascularizada e inervada. A íntima é a camada que reveste diretamente a cavidade articular, é uma camada muito fina cujas células estão localizadas dentro de um leito solto e poroso de fibras de colágeno e outras proteínas de matriz. Como não possui membrana basal e possui grande número de vasos sanguíneos, facilita a passagem de componentes plasmáticos do sangue para cavidade sinovial. O líquido sinovial é um ultrafiltrado do plasma sanguíneo, em que todas as moléculas maiores podem se

mover livremente do sangue para a cavidade sinovial (e vice-versa) (HENDERSON & PETTIPHER, 1985). Os sinoviócitos, células excretoras que formam a íntima, são divididos em duas categorias: sinoviócitos tipo A, semelhantes a macrófagos e envolvidos principalmente com fagocitose, e sinoviócitos tipo B, tipo fibroblastos. Estes últimos são os principais responsáveis pela produção e excreção de proteínas e outras moléculas, como o hialuronato, componente principal do líquido sinovial determinando a viscosidade deste fluido (HENDERSON & PETTIPHER, 1985; STEEL, 2008).

Abaixo da membrana sinovial está a subsinóvia, uma camada mais espessa de tecido conjuntivo frouxo, que contém um sistema extensivo de linfáticos para a seleção das moléculas transportadas. As células da sinóvia formam uma camada descontínua separada por intervalos intercelulares com vários mícrons de largura. A matriz extracelular nestas lacunas contém colágeno e várias outras moléculas, incluindo hialuronato, sulfato de condroitina, proteoglicanos e fibronectina. Ela fornece permeabilidade, através da qual ocorre a troca de moléculas, e resistência para reter moléculas grandes dentro do líquido sinovial (STEEL, 2008).

Considerando a articulação como uma entidade funcional, seus constituintes (cartilagem, osso subcondral, membrana sinovial e estruturas IAs) variam amplamente em suas características metabólicas e taxa de rotatividade. Isto afeta a capacidade de reparação natural e, portanto, o impacto dos danos a estes tecidos. A questão-chave na homeostase articular é se a integridade e funcionalidade do tecido podem ser mantidas. Se este não for o caso, o dano tecidual conduz a uma perda da capacidade de suportar a carga biomecânica, levando a danos estruturais e ao início de um círculo vicioso, sobrecarga relativa e deterioração articular, resultando no desenvolvimento de alterações articulares crônicas como a osteoartrite (OA) (VAN WEREEN, 2016).

A inflamação da membrana sinovial faz parte da patogênese da OA visto que a degradação da cartilagem pode ocorrer na ausência, instabilidade ou ruptura traumática dos tecidos e perda de glicosaminoglicanos. A sinovite aguda e a capsulite são problemas comuns em articulações de alta mobilidade e podem contribuir para o processo de degradação em cartilagem por liberação de enzimas, mediadores inflamatórios e citocinas (McILWRAITH, 2016).

2.1.2 Líquido sinovial

Nas articulações sinoviais, a cartilagem articular carrega e se move em relação às superfícies ósseas opostas, com fricção e desgaste reduzidos por vários mecanismos, incluindo lubrificação de contorno. Nas articulações saudáveis, o líquido sinovial está presente entre as superfícies articulares da cartilagem, funcionando como lubrificação limite efetiva (McILWRAITH, 2016).

O líquido sinovial é um ultrafiltrado do plasma no qual moléculas como nutrientes e citocinas reguladoras são secretadas. A filtração ocorre através da membrana sinovial, e devido à permeabilidade e resistência desta, glicose e os eletrólitos do líquido sinovial encontram-se em concentrações semelhantes às do plasma, contudo a passagem de proteínas é limitada. O liquido sinovial deve conter poucos ou nenhum eritrócito e baixo número de células nucleadas ($<1x10^9$/L), sendo a maioria células mononucleares. A concentração de proteína total do líquido sinovial é de aproximadamente 25% a 35% da concentração de proteína plasmática do animal. As moléculas que se acredita desempenharem um papel fundamental na lubrificação das superfícies articulares são em grande parte produzidas pelas células B da sinóvia e incluem proteoglicano 4, hialuronato e fosfolipídeos de superfície ativa (STEEL, 2008).

A completa análise de líquido sinovial deve envolver a avaliação macroscópica do fluido, contagem de células nucleadas, proteína total e exame citológico. O teste de coágulo de mucina (qualidade de precipitado mucinoso) avalia a qualidade e a quantidade de mucina no líquido sinovial e tornando a análise mais completa (STEEL, 2008). O teste de mucina fornece, grosseiramente, uma estimativa da concentração de ácido hialurônico e do grau de polimerização no líquido sinovial (TULAMO et al., 1989; STEEL, 2008). Após infiltração articular com solução de cloreto de sódio a 0,9% (solução salina) TULAMO et. al (1989) observaram teste de mucina regular ou ruim e atribuíram à resposta inflamatória da sinóvia à presença desta solução salina e ao procedimento de coleta.

Em uma articulação com artrite, a mudança no metabolismo da matriz extracelular resulta na liberação de moléculas e fragmentos de componentes da matriz derivados de tecidos, como a cartilagem articular, no líquido sinovial. Tais substâncias são chamadas de biomarcadores e agem como indicadores de processos anabólicos/metabólicos (STEEL, 2008).

A inspeção visual do líquido quanto à cor e clareza no momento da coleta é extremamente útil, o líquido normal é transparente, amarelo pálido e altamente viscoso. Em situações normais o líquido não coagula visto que não tem fibrinogênio e outros fatores de coagulação. O pH do líquido em articulações saudáveis é de 7,30 ± 0,06. Quando a aparência

do líquido é sanguinolenta, deve-se distinguir a hemartrose de uma hemorragia iatrogênica causada pela artrocentese, o que geralmente é feito no momento da coleta da amostra (STEEL, 2008).

A viscosidade do líquido sinovial está diretamente relacionada à quantidade e grau de polimerização do ácido hiaurônico. Em casos de sinovite a perda de viscosidade pode ocorrer com a diluição do líquido sinovial e a quebra enzimática do ácido hialurônico. A viscosidade é geralmente avaliada subjetivamente, observando-se o comprimento do filete formado pela gota de líquido sinovial expelida do final de uma agulha, que geralmente se rompe entre 5 a 7 centímetros em líquidos sinoviais normais. Alternativamente, uma gota de líquido sinovial pode ser colocada no polegar e depois tocada com o dedo indicador, com a separação do polegar e do dedo normalmente produzindo um filete entre 2,5 e 5 cm de comprimento antes de romper. A diminuição do filete reflete perda da viscosidade que pode ser classificada como normal, diminuída ou marcadamente diminuída. A viscosidade também pode ser avaliada qualitativamente durante o exame citológico, em lâminas feitas manualmente, as células da estão dispostas em filas (um fenômeno conhecido como "windrowing") por causa da viscosidade do fluido, à medida que a viscosidade diminui, as células tornam-se progressivamente mais distribuídas aleatoriamente (STEEL, 2008).

A turbidez do líquido sinovial geralmente é causada pelo aumento da celularidade atribuível a um processo inflamatório. Como um guia, se o grau de turbidez impedir que a leitura da impressão de um jornal seja realizada através da amostra, a contagem de células sugere valor maior que 30.0 x 10^9/células/L, valor sugestivo de infecção (STEEL, 2008).

A concentração de proteína no líquido sinovial pode ser medida por refratometria ou por ensaios bioquímicos. O valor de referência para cavalos normais é de 1.8 g/dL e, em geral, um valor inferior a 2 g/dL é considerado normal. Condições inflamatórias e trauma articular aumentam a concentração de proteína total uma vez que a proteína vaza de vasos danificados. Uma concentração de proteína maior que 4 g/dL pode indicar inflamação grave, com condições inflamatórias não infecciosas geralmente tendo concentrações de proteína menores que esse nível (STEEL, 2008). O aumento da inflamação sinovial resulta no aumento da permeabilidade sinovial às proteínas séricas (KUSHNER e SOMERVILLE, 1971). Tulamo et al. (1989), após administração intra-articular de salina, observaram contagens de leucócitos levemente elevadas acompanhadas por baixos valores de proteína, eles sugerem que níveis de proteína acima de 4 g/dL pode ser um parâmetro útil no diagnóstico de artrite séptica em cavalos.

A contagem total de células nucleadas pode ser feita manualmente usando um microscópio e hemocitômetro, ou, por um contador eletrônico de partículas (analisador automático) que dilua o espécime em tampão isotônico. É importante usar solução salina como diluente e não um diluente que contenha ácido acético, o que precipitaria o complexo de proteína ácido hialurônico (realizando um coágulo de mucina e interferindo na contagem de células). Geralmente, uma celularidade inferior a 1,0 x 10^9/células/L é considerada normal, (STEEL, 2008).

O exame citológico é a parte mais importante da análise do líquido sinovial, onde um líquido normal consiste predominantemente em grandes células mononucleares, derivadas de monócitos sanguíneos, macrófagos teciduais e sinoviócitos, além de células mononucleares pequenas ou linfócitos. Os neutrófilos geralmente representam menos de 10% das células nucleadas e os eosinófilos são raros (<1%). A vacuolização e a atividade fagocítica de células mononucleares e quaisquer alterações degenerativas na morfologia dos neutrófilos são observadas. A mucina aparece como um material róseo finamente granular em todo o fundo de esfregaços (STEEL, 2008).

Os eritrócitos não são considerados constituintes normais do líquido sinovial. No entanto, a maioria das amostras contém alguns e sua presença é geralmente atribuída à contaminação com sangue durante a coleta da amostra. Em casos de inflamação da sinóvia, fluído sanguinolento não é incomum. Eritrofagocitose pode ocorrer quando a hemorragia já tem algumas horas de evolução, nestes casos normalmente se observa aumento da contagem de células e número de neutrófilos, causados pela inflamação da hemorragia. Quando a hemorragia é crônica, caracterizada pela xantocromia (coloração alaranjada) pode ser visível no sobrenadante do fluido, nesses casos o esfregaço pode revelar grânulos de hemossiderina em macrófagos e cristais de hematoidina "livres" no fundo do esfregaço ou nos leucócitos. Como as plaquetas geralmente permanecem no líquido sinovial pouco mais de uma hora após a hemorragia, sua presença sugere contaminação do sangue. No entanto, se ocorrer contaminação sanguínea durante a coleta da amostra e atraso de mais de uma hora entre a coleta e a análise da amostra, ela pode ser confundida com hemorragia patológica, porque degeneração das plaquetas em amostras antigas pode ocorrer *in vitro* (STEEL, 2008).

Sinovite idiopática e a osteocondrite dissecante geralmente estão associadas a um celularidade inferior a 1,0 x 10^9/células/L. Em casos de OA a celularidade pode estar discretamente aumentada ou mesmo dentro dos valores de referência, dependendo do grau de sinovite ativa, nestas condições as células são predominantemente mononucleares e a concentração de proteína pode estar dentro dos limites de referência ou ligeiramente

aumentada. A sinovite traumática pode estar associada a contagem de células inferior à 10,0 x 10^9/células/L com predomínio de neutrófilos.

Artrocentese seguida de administração de solução salina pode produzir aumento significativo na contagem de leucócitos (5 a 40 x 10^9/célula/L) do líquido sinovial em equinos, contagem esta que geralmente é transitória e retorna ao normal entre três e sete dias (WAGNER et. al 1982; STOVE & POOL 1985; MARTIN & McILWRAITH, 1986; TULAMO et. al, 1989). Qualquer substância não esteroide administrada pela via intrasinovial pode produzir inflamação (MARTIN & McILWRAITH, 1986), mesmo fármacos terapêuticos podem provocar reação inflamatória com sinais clínicos e alterações sinoviais que podem mimetizar artrite infecciosa (STOVE & POOL 1985; TULAMO et. al, 1989). Isso destaca o potencial para alterações significativas nos parâmetros clinico patológicos do líquido sinovial com o que pode ser considerado um insulto traumático ou químico menor (STEEL, 2008).

Wagner et. al (1982) observaram uma resposta inflamatória acentuada com aumento da contagem de leucócitos e concentração de proteína nas articulações intercapianas saudáveis de equinos após infiltração de solução salina. Martin & McIlwraith (1986) observaram reação inflamatória após administração de ontosein (forma purificada de superóxido dismutase) e solução salina no carpo de equinos. Após 24 horas da administração houve aumento de proteínas e neutrófilos no líquido sinovial, demonstrando inflamação aguda. No entanto, Stove & Pool (1985) verificaram que as articulações radiocárpicas submetidas apenas a artrocentese também apresentaram aumento nesses valores, demonstrando inflamação. Tulamo et. al (1989), após sepse articular induzida na articulação tarsocrural por Staphylococcus e utilizando a articulação contralateral como controle com injeção de salina, observaram que, em ambos os tratamentos, após artrocentese seriada não foi possível afirmar se a contagem de leucócitos e proteína refletiam apenas a amostra de líquido sinovial ou havia influência da contaminação sanguínea, inevitável com repetidas artrocenteses. Pozzobon et. al (2009) observaram após artrocenteses seriadas em articulações cárpicas sadias de pôneis, aumento da contagem de proteína e percentagem de neutrófilos; esse aumento foi atribuído à hemorragia articular causada pelo trauma das artrocenteses repetidas, pois na hemartrose ocorre exsudação neutrofílica. Neste trabalho a artrocentese repetida não modificou a viscosidade e qualidade da precipitação da mucina nas articulações sadias.

Tulamo et al., (1989) observaram, após a administração de salina e artrocenteses seriadas, aumento no número de neutrófilos. Contudo as contagens não aumentaram progressivamente e seus números absolutos diminuíram até o final do experimento indicando que as articulações toleraram o trauma capsular repetido das artrocenteses. Já em casos de

sepse, neutrofilia (90% ou mais) e degeneração de neutrófilos, embora não comum, pode ser observada (TULAMO et. al, 1989). Após infiltração da bainha do tendão flexor digital profundo, Dykgraaf et. al (2007) observaram celularidades acima de 30.000 células/µl com predomínio de neutrófilos entre 12 e 24 horas após a administração de amicacina e solução de ringer lactato. Houve, contudo, resolução espontânea e diminuição na celularidade nas punções seguintes, sugerindo reação inflamatória aguda, neste estudo não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

2.1.3 Cartilagem articular

Em 1743, Hunter, já reconhecia o complexo mecanismo articular afirmando que uma cartilagem ulcerada constituía um grande problema, visto que quando destruída nunca é recuperada.

As articulações do esqueleto axial consistem das superfícies articulares de pelo menos dois ossos, cobertas por uma fina camada de cartilagem hialina, além da cápsula articular e ligamentos, que envolvem e estabilizam a articulação (NICKEL et al., 1986) (Figura 1).

A cartilagem articular não possui estruturas vulneráveis (por exemplo, vasos sanguíneos, nervos, vasos linfáticos), não há nenhum epitélio entre a superfície articular e fluido sinovial e a densidade das células (condrócitos) é baixa, aproximadamente 5% do volume de tecido. Os condrócitos são as únicas células constituintes da cartilagem articular, participando ativamente do metabolismo da matriz e são responsáveis por manter a saúde da cartilagem sob as condições de carga prevalentes através de um delicado equilíbrio entre síntese e degradação das macromoléculas da matriz extracelular (HALL et al., 2003; VAN WEEREN, 2016).

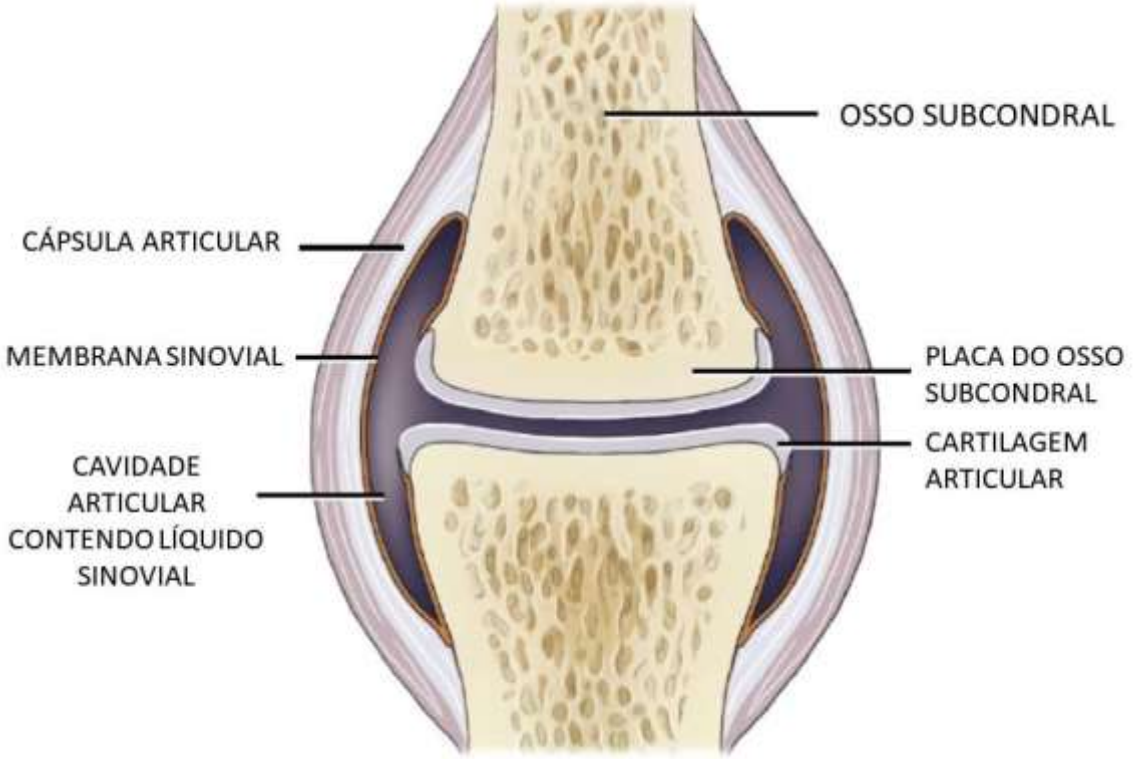

Figura 1 - Representação esquemática de uma articulação diartrodial (Adaptado de VAN WEEREN, 2016).

Os condrócitos ocupam pequenas lacunas situadas na matriz extracelular, e este efeito protetor da matriz pode ser afetado por agentes altamente tóxicos (como a bupivacaína e mediadores inflamatórios, por exemplo) causando danos às cartilagens intactas (GARTNER & HIATT, 2003; PARK et al., 2011). A matriz extracelular circunda os condrócitos normais e possui função condroprotetora, tanto química quanto mecânica. Como não possui vasos sanguíneos, a nutrição dos condrócitos se dá pela difusão do líquido sinovial, que também serve para remoção dos produtos residuais. Pela mesma razão, os estímulos químicos e hormonais da sinóvia também alcançam os condrócitos através do mesmo líquido sinovial (TODHUNTER, 1996).

As propriedades mecânicas da cartilagem articular resultam principalmente da composição e estrutura da matriz extracelular (TODHUNTER, 1996), que é composta por colágeno, proteoglicanos (PG), água e pequena quantidade de componente celular (GARTNER & HIATT, 2003; PLATT, 1996; VAN WEREEN, 2016).

O colágeno tipo II é o principal colágeno existente na cartilagem articular perfazendo 85-90% dos colágenos totais, organizado em uma forma de rede que se estende ao longo da cartilagem que está embebida com uma alta concentração de PG, proporcionando resistência. O equilíbrio entre a tensão na rede de colágeno e a pressão osmótica dos PG determina a característica biomecânica da cartilagem articular, isto é, as propriedades viscoelásticas. Tais propriedades dependem da integridade desta rede de colágeno e da síntese e retenção de altas concentrações de PG dentro da matriz extracelular (PLATT, 1996; TODHUNTER, 1996; HALL et al., 2003; VAN WEREEN, 2016).

Os PG são formados por agregados de proteínas intracelulares ligadas a glicosaminoglicanos (GAGs) que, por sua vez, são estruturas que possuem um dos açúcares aminados e normalmente sulfatados, intercalados entre as fibras de colágeno e ligadas a elas diretamente ou através de moléculas de hialuronato (ácido hialurônico) (VAN WEREEN, 2016), formando uma grande molécula responsável pelo estado de gel da matriz extracelular. O agrecan é um PG específico da cartilagem, perfaz aproximadamente 90% da massa total de PG, e confere a consistência gel a matriz através da sua ligação com hialuronato (GARTNER & HIATT, 2003). Os PG compreendem um núcleo central de proteína ao qual um ou mais GAGs estão ligados, principalmente o sulfato de condroitina e o sulfato de keratan. Estas moléculas poliônicas imóveis atraem cátions (principalmente Na^+) e, por conseguinte, atraem água. O equilíbrio entre as moléculas de agrecan e a tensão nas fibras de colágeno confere à matriz extracelular a capacidade para resistir e distribuir a compressão decorrente da carga mecânica (HALL et al., 2003).

As articulações devem ser fortes para suportar as forças transmitidas durante o movimento (VAN WEEREN, 2016). A cartilagem hialina, juntamente com o fluido sinovial, tem a capacidade de absorver e distribuir as cargas sobre as extremidades dos ossos, suportando grandes estresses cíclicos e tensões que ocorrem durante o movimento articular, minimizando, desse modo, as tensões focais sobre o osso subcondral (HALL et al., 2003).

As características biomecânicas inerentes à cartilagem dependem da tensão mecânica prevalente sobre a superfície exposta. No entanto, as lesões cartilaginosas podem ocorrer em cavalos atletas como resultado de tensões físicas de intensidade, duração e frequência anormais. A maioria das lesões articulares é causada pela fadiga da estrutura articular quando a taxa de micro danos supera a taxa de reparação da cartilagem, que é extremamente baixa (HALL et al., 2003; McILWRAITH, 2016).

Na cartilagem saudável há um baixo *turnover* de moléculas de matriz extracelular, e o equilíbrio adequado de atividades anabólicas e catabólicas é crucial para a manutenção da

integridade do tecido cartilaginoso e reparo de danos moleculares sofridos. Na presença de uma OA, esse equilíbrio é comprometido e a degradação predomina sobre a capacidade de reparo. Tem sido proposto que os efeitos da carga mecânica anormal na inflamação sinovial provavelmente contribuem para a desregulação da função dos condrócitos favorecendo o desequilíbrio entre as atividades catabólica e anabólica dos condrócitos na remodelação da matriz extracelular da cartilagem. Ocorre perda local de proteoglicanos e clivagem do colágeno tipo II inicialmente na superfície da cartilagem onde houve um aumento compensatório na síntese de colágeno tipo II em regiões mais profundas da cartilagem articular, significando mudanças aumentadas tanto no anabolismo quanto no catabolismo (McILWRAITH, 2016).

Após a maturidade esquelética não há mais condrócitos em mitose e, por conseguinte nenhum condrócito perdido é substituído, deixando as células restantes com uma carga maior para manter o metabolismo da matriz. Desta forma uma vez degradada, a cartilagem articular não possui capacidade de autorregeneração e, quando ocorre perda de cartilagem com exposição do osso subcondral, há a formação de um tecido cicatricial fibroso, que pode ou não sofrer metaplasia para fibrocartilagem. Isto ocorre devido ao potencial mitótico limitado dos condrócitos e a produção ineficaz de colágeno e PG (reparo intrínseco) (HALL et al., 2003; McILWRAITH, 2016; ROCHA JUNIOR et al., 2016). Reitera-se que, devido a essa baixa taxa de regeneração, a extrema importância em determinar a toxicidade das medicações aplicadas pela via IA para que haja preservação dos condrócitos e consequente manutenção da homeostase, visto que os danos à cartilagem e perda de condrócitos são irreversíveis.

A OA equina pode ser considerada um grupo de desordens caracterizadas por um estágio final comum: deterioração progressiva da cartilagem articular acompanhada de alterações nos ossos e tecidos moles da articulação. Os processos de doença da OA não afetam apenas a cartilagem, mas também envolvem toda a articulação, incluindo o osso subcondral, ligamentos, cápsula, membrana sinovial e tecidos peri-articulares. Ao final do processo a cartilagem articular degenera com fibrilação, fissuras, ulceração e perda total da espessura da superfície articular (McILWRAITH, 2016).

Equinos atletas possuem maior risco para o desenvolvimento de OA. Atividades de alto impacto das articulações podem diminuir o conteúdo de proteoglicanos da cartilagem, aumentar níveis de enzimas degradativas e causar apoptose de condrócitos. O equilíbrio das atividades anabólicas e catabólicas é crucial para a manutenção da integridade da cartilagem e para o reparo de dano molecular sofrido (McILWRAITH, 2016).

2.2. Claudicação em equinos

A ocorrência de lesões musculoesqueléticas e seu impacto negativo na indústria do cavalo estão bem documentados na literatura, onde a claudicação representa a causa mais importante da perda prematura de cavalos de esporte e consequentes perdas financeiras ao proprietário (ROSSDALE et al., 1985, STOVER, 2003). Alguns estudos epidemiológicos relatam incidência de claudicação de até 53%, sendo que em 20% dos casos a claudicação foi suficientemente grave a ponto de causar a retirada dos animais das corridas (JEFFCOTT, 1982). Entre os anos de 1982 e 1983 um estudo epidemiológico estimou que 68% dos dias de treinamento perdidos estavam relacionados à claudicação (ROSSDALE et al, 1985). Entre as causas de claudicação as doenças articulares, frequentes em cavalos (McILWRAITH, 2016), perfazem aproximadamente 15% da casuística (USDA, 2000). Na Alemanha, Lindner (1993) registrou, durante uma temporada de corridas, que a porcentagem de falha no treinamento ligada à claudicação foi de 57% nos cavalos Puro Sangue de Corrida. Neste contexto, 40% dos casos de claudicação têm como causa primária as doenças articulares, representando grande parte da rotina do médico veterinário de equinos. Alterações na cartilagem têm sido identificadas como importantes fatores predisponentes na maioria dos casos (HALL et al., 2003). Dyson et al, (2008) observaram que houve pouca mudança quanto a causa de falha no treinamento nas últimas décadas, visto que, após 20 anos de estudo, a claudicação ainda continua sendo a principal responsável pela perda de dias de treinamento, o que realça a necessidade de estudos para minimizar este impacto.

A prevalência, incidência e distribuição de lesões musculoesqueléticas são apontadas em estudos epidemiológicos onde as populações de risco são identificadas, subsidiando informações para o diagnóstico precoce. A gestão destes fatores de risco pode conduzir a uma melhor prevenção de lesões (STOVER, 2003). Neste sentido, as pesquisas direcionadas ao diagnóstico precoce, terapia e profilaxia de doença articular merecem prioridade, a fim de reduzir as perdas seja com queda de performance ou perda de jovens cavalos de esporte.

Na medicina equina, o diagnóstico da claudicação é feito através do exame clínico detalhado que inclui a utilização de agentes anestésicos locais que, dependendo de sua aplicação (regional ou local), permitem identificar com precisão a origem da dor. Considerando isso, inúmeros estudos foram realizados para melhor compreender a ação dos mesmos e o significado de respostas clínicas à sua utilização (PLEASANT et al., 1997; SCHUMACHER et al., 2001a; SCHUMACHER et al., 2001b; SCHUMACHER et al., 2003, RUNGSRI et al., 2014).

Estudos anteriores demostram que agentes anestésicos tais como lidocaína, bupivacaína e ropivacaína aplicados no espaço subcutâneo no bloqueio dos ramos do nervo digital palmar, foram capazes de bloquear a claudicação induzida no casco, cinco minutos após a sua aplicação (SILVA et al, 2015). Contudo Schumacher et al., (2013) demonstram que o bloqueio digital palmar não traz informações específicas sobre a origem da dor ou a estrutura lesionada, já que dessensibiliza a articulação interfalangeana distal, a bursa do navicular e outras estruturas localizadas dentro do casco dos equinos. A avaliação do bloqueio anestésico deve levar em consideração a anatomia, as doses e volumes utilizados, assim como o tempo de avaliação, visto que o fármaco sofre difusão e pode atingir estruturas adjacentes.

2.3. Anestésicos intra-articulares (IA)

Os anestésicos locais são amplamente utilizados na prática de medicina de equinos para diagnóstico de lesões musculoesquelético dos membros (SANTOS et al, 2009). Além da sua utilização para anestesia regional ou local através da deposição subcutânea, estes fármacos também têm sido utilizados pela via IA, em administração única ou contínua, há bastante tempo no suporte analgésico após artroscopias em animais e seres humanos (BAKER & MULHAL, 2012; PIAT et al., 2012). Entretanto, sua aplicação não é livre de complicações. Em humanos, após a adoção desta forma de analgesia, se percebeu um aumento nos casos de condrólise glenohumeral, despertando o interesse em determinar o possível efeito tóxico dos anestésicos sobre os condrócitos. Embora as causas desta condrólise ainda sejam desconhecidas, se acredita que a infusão contínua de bupivacaína seja uma causa potencial (BAKER & MULHAL, 2012).

A potência, estabilidade, toxicidade e capacidade de se difundir em diferentes tecidos e a ação farmacológica dos anestésicos locais se baseia no bloqueio da condução nos neurônios sensoriais retardando o influxo de íons de Na^+ (SANTOS et al, 2009). O tipo e número de anestésicos IA disponíveis têm aumentado nos últimos anos e embora a maioria não cause problemas, alguns podem ter efeitos colaterais adversos. Estes agentes anestésicos locais são considerados relativamente seguros, especialmente quando administrados na localização anatômica precisa e com a dose apropriada. Contudo, mesmo após a injeção precisa da dose apropriada, algumas complicações relacionadas à toxicidade ainda podem ocorrer, dependendo da dose e toxicidade específica de cada fármaco (PARK et al., 2011).

Em equinos, o diagnóstico de claudicação é realizado, na maioria dos casos, por meio das informações obtidas no exame clínico, exame em movimento, resposta aos bloqueios

anestésicos e alterações identificadas nos exames de diagnóstico por imagem (HUNT, 2006). A realização destes bloqueios anestésicos é um ponto muito importante na identificação da origem da dor (SCHRAMME et al., 2015; TURNER, 1996). A escolha do anestésico local baseia-se principalmente na duração do seu efeito analgésico. O intervalo de tempo em que há analgesia efetiva da lidocaína, bupivacaína e ropivacaína é de 5 a 60, 5 a 90 e 5 a 180 minutos, respectivamente (SILVA et al., 2015). Para que sejam usados pela via IA com segurança também é preciso considerar os possíveis efeitos deletérios de cada anestésico, evitando o uso das medicações mais irritantes, principalmente em articulações com grande amplitude de movimento.

O estudo da toxicidade de fármacos pode ser realizado através de cultivos celulares; da mesma forma os estudos com cultivo em monocamada de condrócitos têm sido reproduzidos em diferentes espécies para avaliar diferentes fármacos (AHMED, 2007; DRAGOO et al., 2008; PIPER & KIM, 2008; BAKER et al., 2011; PARK et al., 2011; BREU et al, 2013). É importante mencionar que os modelos de cultura em monocamada são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos destes agentes anestésicos do que os modelos de explante ou núcleos osteocondrais (BAKER & MULHAL, 2012). Entretanto, os estudos *in vivo* ainda são mais efetivos para determinar potenciais efeitos tanto negativos quanto positivos destes compostos em pacientes, visto a dificuldade de se reproduzir *in vitro* os eventos dinâmicos que promovem alterações na concentração dos componentes (PIAT et al., 2012).

Rotineiramente, a lidocaína, mepivacaína ou bupivacaína são empregados no manejo da dor pós-operatória ou na tentativa de isolar sua origem quando do exame de claudicação. Excetuando-se a mepivacaína, os demais são facilmente encontrados no mercado brasileiro. Embora a mepivacaína seja o anestésico local mais frequentemente utilizado em medicina equina em vários países, agentes de longa ação como a bupivacaína e ropivacaína têm sido recomendados para analgesia pós-operatória (PARK et al., 2011).

O cloridrato de mepivacaína é um anestésico local do tipo amida amplamente utilizado para fornecer analgesia IA e perineural durante os exames de claudicação em equinos. Mesmo sendo o anestésico de eleição em uso IA nesta espécie, Bolt et al. (2008) demonstraram o potencial condrotóxico da mepivacaína. A mepivacaína se apresentou mais tóxica que outras substâncias como a triancinolona, hialuronato de sódio e sulfato de amicacina, também comumente usados por via IA. Achados histológicos sugerem que a mepivacaína pode, quando em contato direto, exercer efeito tóxico sobre condrócitos (BOLT et al., 2008). Estas informações ressaltam a importância da pesquisa de anestésicos locais com potencial ainda menos tóxico que a mepivacaína.

Os efeitos tóxicos e inflamatórios do uso IA dos anestésicos locais são amplamente discutidos. White et al. (1989) demonstraram que lidocaína, mepivacaína e artrocenteses seriadas produzem irritação ao ambiente sinovial em equinos, neste caso o aumento da celularidade foi o melhor marcador inflamatório visto que não foram observadas mudanças quanto a qualidade do coágulo de mucina, conteúdo de ácido hialurônico, proteína total e imunoglobulina G. Chu et al. (2006) observaram que a bupivacaína 0,5% é citotóxica para condrócitos bovinos em cultura de alginato e em núcleos osteocondrais após 15 e 30 minutos de exposição *in vitro*. Os dados sugerem que a superfície articular intacta fornece alguma proteção contra os efeitos citotóxicos da bupivacaína, contanto sabe-se que a cartilagem articular de pacientes submetidos à artroscopia é frequentemente fissurada e fibrilada. As camadas mais profundas de cartilagem nessas áreas de lesão não estariam protegidas e os condrócitos nessas áreas estariam mais expostos aos agentes injetados na articulação durante a cirurgia (CHU et al., 2006).

Em um estudo *in vivo* em coelhos avaliando-se a bupivacaína intra-articular e neostigmina, os autores concluíram que ambos os agentes causaram alterações histopatológicas, com 0,5% de bupivacaína causando maior inflamação da cartilagem articular no dia 10. Contudo o aumento da inflamação da sinóvia e da cartilagem foi notável dentro de 24 horas após a injeção (DOGAN et al, 2004).

Atualmente a ropivacaína vem sendo sugerida como uma possibilidade analgésica de longa duração com menores efeitos tóxicos que a bupivacaína (PARK et al., 2011; PIPER & KIM, 2008). Trata-se de um anestésico local amino-amida de longa duração com propriedades físicas, dinâmicas e cinéticas semelhantes às da bupivacaína, mas com menor toxicidade neuronal e cardíaca. Além disso, sua solubilidade em lipídeos é menor, principalmente em fibras motoras mielinizadas (alfa), contribuindo para um retorno mais rápido da função motora (SANTOS et al., 2009).

Breu et al. (2013) afirmam que a condrotoxicidade da bupivacaína, ropivacaína e mepivacaína são dependentes do tempo e concentração do fármaco, sendo que a exposição de cultivos de condrócitos a concentrações de até 0,25% de bupivacaína, 0,5% de ropivacaína e 0,5% de mepivacaína não revelou condrotoxicidade significativa. Contudo, Park et al. (2011) presumem que o efeito tóxico dos anestésicos locais em articulações também possa ocorrer em menos de uma hora após a aplicação, levantando a pergunta sobre os possíveis efeitos inflamatórios a curto prazo sobre o ambiente IA. Ainda existem divergências sobre este tema com argumentos de que a condrotoxicidade dos anestésicos locais promoveria a ruptura da homeostase da cartilagem articular e consequentemente toxicidade (PIAT et al., 2012). Como

a perda de condrócitos tem sido implicada no desenvolvimento da OA, é crucial determinar os efeitos deletérios dos anestésicos locais nestas células (BREU, 2013).

Mesmo com potencial tóxico comprovado, alguns autores atribuem possíveis efeitos anti-inflamatórios aos anestésicos locais, como por exemplo, Santos et al. (2009) que observaram diminuição na contagem de células nucleadas após sinovite induzida por lipolissacarídeos (LPS) na articulação radiocarpiana de equinos após administração IA de ropivacaína. Da mesma forma, em condrócitos de ratos estimulados com IL-1, a ropivacaína foi capaz de atenuar os níveis de expressão de MMP-1, MMP-3 e IL-6, sugerindo que a ropivacaína pode restaurar a homeostase e prevenir danos na cartilagem (YAO et al., 2018).

Embora o mecanismo da toxicidade ainda seja uma questão a ser definitivamente esclarecida, recomenda-se cautela no uso IA de anestésicos locais para promover analgesia prolongada (BAKER & MULHAL, 2012). A avaliação da toxicidade dos anestésicos locais através de cultivos de condrócitos pode render informações valiosas na compreensão dos efeitos deletérios destes fármacos, avaliando-se o efeito isolado da droga sobre as células primordiais da cartilagem. Com o conhecimento dos mecanismos da toxicidade de cada fármaco é possível selecionar o fármaco mais seguro para cada caso clínico.

2.4. Modulação inflamatória

Dada à limitada capacidade de reparo funcional da cartilagem adulta, a preservação da cartilagem, com base na manutenção de um equilíbrio entre anabolismo tecidual e degradação, é primordial para a função articular. Fatores de crescimento como fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento transformador β1 (TGF-β1), bem como citocinas como interleucina-1β (IL-1β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF-α) e a proteína 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB-1) são os principais envolvidos nos eventos moleculares de remodelação e degradação da cartilagem. Diferentemente da cartilagem, a membrana sinovial é bem vascularizada e inervada, e os sinoviócitos ativados liberam uma série de mediadores inflamatórios, incluindo cininas, leucotrienos, prostaglandinas e proteínas de fase aguda, como a amilóide sérica A (FRISBIE et al., 2016).

As citocinas agem em resposta a estímulos químicos conhecidos como mediadores. Atualmente, os principais mediadores considerados importantes na doença articular incluem metaloproteinases, agrecanases, prostaglandinas, radicais livres, citocinas, IL-1 e possivelmente TNFα (McILWRAITH, 2016). Por exemplo, a IL-1, pró-inflamatória, está

presente em grande parte dos tecidos corporais e é produzida principalmente pelos macrófagos. A IL-1ß tem sido chamada de citocina mestre na OA humana e sua principal função no ambiente articular é de regular a resposta de fase aguda (TIZARD, 2002; KAMM et al., 2010). Estudos sobre citocinas nos tecidos articulares sugerem que a IL-1 e o TNFα modulam a síntese de metaloproteinases por condrócitos e células sinoviais e são, portanto, importantes mediadores da doença articular. A rotatividade normal da matriz extracelular é provavelmente regulada pelos condrócitos sob o controle e influência de citocinas e estímulos. A degradação da cartilagem articular representa uma exacerbação desses processos normais. A citocina IL-1 induz a depleção de proteoglicanos e da cartilagem articular aumentando a taxa de degradação ou diminuição da síntese em associação com a liberação de MMPs, agrecanases e PGE_2 pelos condrócitos (McILWRAITH, 2016) (Figura 2).

Juntamente com o TNFα, a IL-1 contribui com a destruição articular induzida pela degradação das proteases, ativação de células sinoviais, fibroblastos sinoviais e condrócitos que secretam prostaglandina E_2 (CAMPEBELL et al., 2004). Tal como a IL-1ß, o receptor de TNFα também está mais expresso nas cartilagens com OA. Além disso, os receptores da enzima que converte o TNF na sua forma ativa estão mais expresso nas articulações com OA (KAMM et al., 2010). A IL-1 parece estar envolvida em todos os estágios da OA, enquanto o TNFα está envolvido, principalmente, na fase inicial (McILWRAITH, 2016).

Entre as citocinas reguladoras, existem a interleucina (IL)-4, -10 e -13 cuja principal função é inibir a produção das citocinas catabólicas, tais como a IL-1 e o TNFα (BLOM et al., 2007). A IL-10 é uma citocina que exerce efeito principalmente anti-inflamatório, devido ao seu poder de inibição da produção de citocinas pelos linfócitos Th1 e pelos monócitos, principalmente a IL- 1, -6 e o TNFα (BACH & CHATENOUD, 2002).

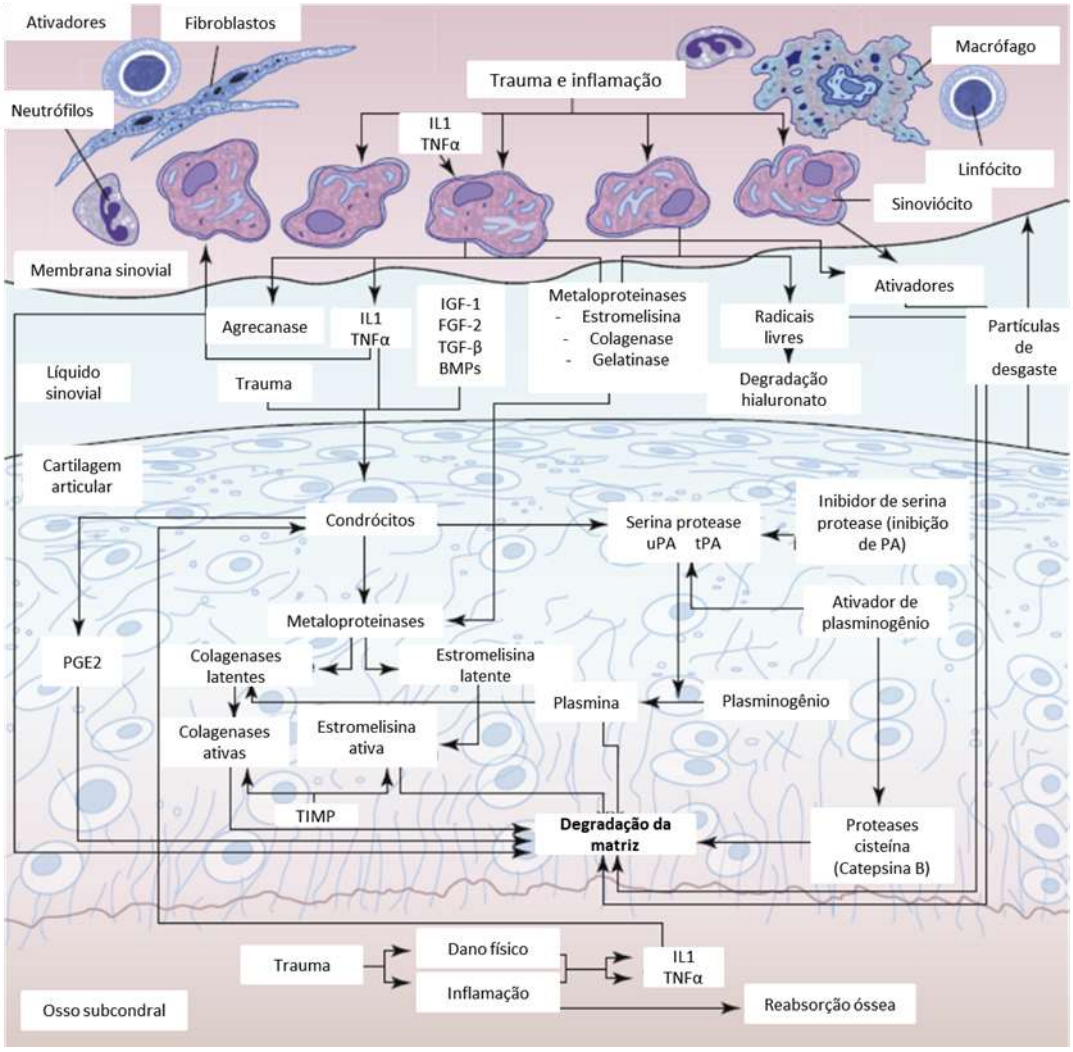

Figura 2 - Fatores envolvidos na degradação enzimática da matriz da cartilagem articular. BMPs: proteínas morfogenéticas ósseas; FGF-2: fator de crescimento de fibroblastos-2; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; IL1: interleucina-1; TGF-β: fator de crescimento transformador β; PA: ativador de plasminogênio; PG: prostaglandina; PLA2: fosfolipase A2; PGE_2: prostaglandina E (2); TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinases; TNFα: fator de necrose tumoral-α; tPA: ativador do plasminogênio tecidual; uPA: ativador do plasminogênio da uroquinase (MCILWRAITH, 2016).

A modulação inflamatória IA é resultante da maior ou menor produção de ILs, sendo que o equilíbrio entre as ILs pró- e anti-inflamatórias determina a taxa metabólica da cartilagem articular (SÁNCHEZ RAMÓN et al., 2011). A importância na diferenciação das moléculas no processo de desenvolvimento de OA é também um fator crítico para o desenvolvimento de terapias biomédicas. A aplicação adequada de controles biomoleculares pode atenuar os processos catabólicos, preservando a matriz existente (KAMM et al., 2010).

O receptor de IL-1ß está mais concentrado na cartilagem das áreas que circundam a lesão do que em áreas mais afastadas na mesma articulação. O aumento de IL -1ß leva ao aumento de enzimas proteolíticas (metaloproteinases (MMPs) e agrecanases), causando

destruição da matriz da cartilagem. Além disso, o tratamento *in vitro* de cartilagem com IL-1ß diminui o perfil anabólico dos condrócitos, favorecendo a supressão na síntese de agrecan e colágeno. Apesar disso, a expressão de IL-1ß tem um papel importante na homeostase da cartilagem (KAMM et al., 2010).

A citocina IL-1 suprime a síntese de PG da cartilagem articular e estimula a sua degradação *in vitro*. Estudos utilizando anticorpos neutralizantes contra IL-1 demonstram que esta citocina é responsável por uma parte considerável da inibição da síntese de PG da cartilagem durante uma sinovite induzida. A administração de IL-1 no espaço articular provoca inflamação transitória, supressão da síntese de PG da cartilagem articular e estimulo da degradação de PG (VAN BEUNINGEN et al., 1994). O papel da IL-1 na produção de OA em articulação carpiana de equinos foi demonstrado pela inibição total da produção de OA por terapia gênica com antagonistas do receptor de interleucina-1 (IL-1ra) (FRISBIE et al., 2002).

Nas articulações afetadas com OA tanto o TNFα como a IL-1ß estão aumentados. Eles se ligam a diferentes receptores, mas causam um aumento semelhante no fator nuclear kappa B (NFkB), um fator de transcrição que se liga a elementos reguladores no DNA para aumentar a atividade de transcrição, e de N-terminal kinase (JNK), uma quinase que controla a ativação nuclear e mitocondrial de outras moléculas. Estes intermediários aumentam a transcrição de MMPs, ciclooxigenase-2 (COX-2) e indução de óxido nítrico sintase (iNOS). Como resultado final temos o aumento da degradação na cartilagem e liberação de prostaglandinas levando a edema e dor articular (KAMM et al., 2010).

No tecido sinovial as células mononucleares, os fibroblastos e sinoviócitos, contribuem com a síntese excessiva da IL-6 (FIRESTEIN et al., 1990), geralmente produzida em resposta a estímulos específicos como a liberação de lipopolissacarídeos da membrana celular de bactérias e estímulo de outras citocinas como IL-1, TNF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) ou a própria IL-6 (PABLOS ALVAREZ, 2009). Seus efeitos diretos na cartilagem são incertos, porém se sabe que a IL-6 atua nos condrócitos bloqueando a síntese da matriz cartilaginosa (LEGENDRE et al., 2003). Dentre os efeitos locais importantes da IL-6, estão as lesões articulares inflamatórias crônicas, como a erosão óssea, possivelmente de caráter autoimune, e um dos fatores fisiológicos mais importantes da reabsorção óssea (PABLOS ALVAREZ, 2009).

A OA é marcada pela ruptura da matriz extracelular e a pesquisa no desenvolvimento de biomarcadores tem se concentrado na identificação de subprodutos de colágeno tipo II, síntese e degradação de agrecan, sendo que a avaliação destes marcadores pode contribuir no

diagnóstico precoce de doenças articulares (NICHOLSON et al., 2010). Sabe-se que o colágeno tipo II e o agrecan compõem a maior parte da matriz extracelular da cartilagem articular (NICHOLSON et al., 2010). O agrecan, organizado através das cadeias de ácido hialurônico no complexo da matriz, é susceptível à degradação em locais específicos por duas agrecanases, agrecanase-4 (ADAMTS-4) e agrecanases-5 (ADAMTS-5), que clivam o agrecan e, como este PG representa uma porção significativa da matriz extracelular da cartilagem, a clivagem diminui a capacidade da cartilagem para resistir a forças compressivas (KAMM et al., 2010; McILWRAITH, 2016). Fragmentos gerados por clivagem em locais específicos na proteína do núcleo do agrecan têm sido descritos e são detectáveis na cartilagem e no líquido sinovial de articulações com OA em vários modelos experimentais, em humanos sugere-se que tanto ADAMTS-4 como ADAMTS-5 contribuam para o dano estrutural que caracteriza a OA (SONG et al, 2007).

Os níveis de agrecan apresentam diminuição significativa na cartilagem com OA (KAMM et al., 2010), sendo a agrecanase a principal enzima responsável pela sua degradação (McILWRAITH, 2016). Nestes casos a expressão de colágeno tipo I está aumentada na sinóvia, sendo provável consequência da proliferação de fibroblastos na membrana sinovial (KAMM et al., 2010). Estes autores observaram elevação apenas de ADAMTS-4, e não de ADAMTS-5 na cartilagem de articulações com OA, sugerindo que ADAMTS-5 não é aumentada pelo fluxo de IL-1ß em condrócitos equinos, em casos de OA progressiva.

Embora a IL-1ß suprima a expressão do colágeno tipo II em estudos *in vitro* e que o colágeno tipo II possa estar reduzido em casos de OA avançada, Kamm et al. (2010) mostraram que a expressão de colágeno tipo II diminui de normal para leve em casos de OA moderada, visto que zonas mais profundas de cartilagem são capazes de expressar de forma compensatória maior quantidade de colágeno mesmo quando a cartilagem apresenta erosões mais profundas. Segundo Nicholson et al. (2010) os níveis de colágeno tipo II também podem ser afetados pela idade do cavalo, presença de lesão osteocondral e pelo tipo de articulação envolvida em cavalos Puro Sangue de Corrida.

Acredita-se que a clivagem do colágeno tipo II seja mediada principalmente por colagenases que pertencem à família das MMPs, a expressão destas colagenases está aumentada nos casos de OA e, experimentalmente, a digestão do colágeno pode ser bloqueada por inibidores das colagenases 2 e 3 (DAHLBEG et al., 2000).

MMPs são um grupo de enzimas endopeptidases dependentes de zinco envolvidas na degradação da matriz extracelular e capazes de degradar todos os componentes da matriz extracelular (McILWRAITH, 2016). Embora a expressão de MMPs contribua para o

remodelamento tecidual e rotatividade na cartilagem articular saudável, no desenvolvimento de OA citocinas pró-inflamatórias como a IL-1β ativam seus receptores em condrócitos e ativam vias de sinalização que envolve os fatores de transcrição NF-κB e ativação da proteína-1 (AP-1) resultando no aumento da expressão de MMPs. A colagenase primária envolvida na degradação do colágeno tipo II da cartilagem articular é colagenase 3 (MMP-13). As MMPs são enzimas proteolíticas essenciais para o metabolismo da matriz cartilaginosa e peças chave em condições patológicas como OA. Atividade elevada de MMPs em cavalos jovens é indicativo de remodelação de tecidos durante o crescimento; já em cavalos adultos a atividade fisiológica de MMPs é baixa e o aumento da sua atividade no líquido sinovial indica destruição da matriz (BRAMA et al., 1998). Portanto, a presença e os níveis de MMPs podem depender do status e de variações individuais (CLUTTERBUCK et al, 2010), podendo tornar uma ferramenta útil em estudos de diagnóstico, terapêuticos ou de prognóstico em cavalos com suspeita de OA.

Durante as fases de crescimento e regeneração, os componentes da matriz são degradados e sintetizados de forma regulada. As MMPs facilitam essa degradação e são controladas por dois inibidores endógenos de metaloproteinases (TIMPs), conhecidos como TIMP-1 e TIMP-2 (CLUTTERBUCK et al., 2010; McILWRAITH, 2016). TIMP é encontrado em muitos tecidos conjuntivos e pode ser o inibidor mais importante encontrado na cartilagem articular. Acredita-se que o equilíbrio entre MMPs e TIMP seja importante no controle da degradação da cartilagem articular (McILWRAITH, 2016) (Figura 3).

O equilíbrio dinâmico no qual MMPs e TIMPs ativos é crucial para muitos processos fisiológicos, como o crescimento. No entanto, alterações neste equilíbrio podem ter consequências locais e sistêmicas. Atividade excessiva de MMPs tem sido relatada em doenças degenerativas como OA e por outro lado, a produção excessiva de TIMP está envolvida em condições como fibrose hepática. Assim, a prevenção de excesso ou subatividade é de extrema importância no tratamento de doenças relacionadas com MMP (CLUTTERBUCK et al., 2010).

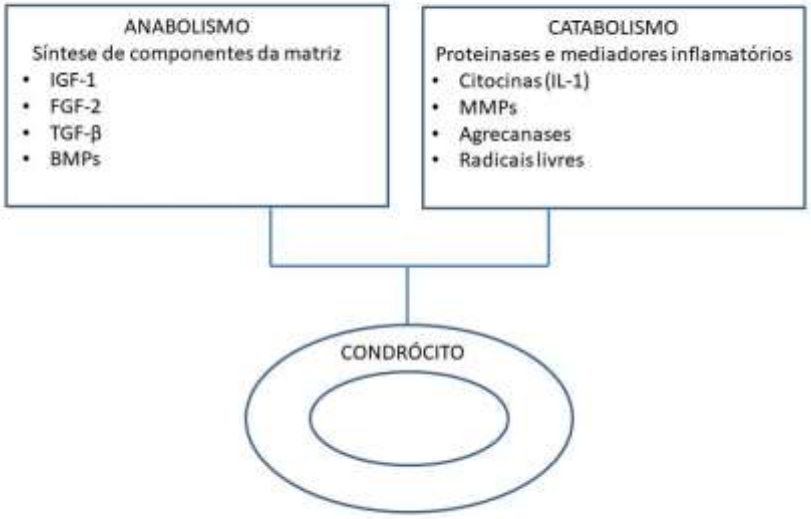

Figura 3: Homeostase na cartilagem articular relacionada ao balanço entre os fatores anabólicos e catabólicos (Adaptado de McILWRAITH, 2016).

As prostaglandinas (principalmente o grupo E) são produzidas em articulações e podem causar uma diminuição no conteúdo proteoglicano da matriz cartilaginosa. Prostaglandina E_2 (PGE_2) está presente em articulações inflamadas, sendo considerado um dos principais mediadores de inflamação e dor na OA. A produção de PGE_2 requer duas enzimas, ciclo-enzimas-2 (COX-2) e prostaglandina E sintase, as quais são induzidas por IL-1β. Ações da PGE_2 nas articulações incluem vasodilatação, aumento da percepção da dor e depleção de proteoglicanos da cartilagem (tanto pela degradação quanto pela inibição da síntese), desmineralização óssea, e promoção da secreção do ativador do plasminogênio. PGE_2 é liberado de condrócitos na estimulação dessas células por IL-1 e TNFa (McILWRAITH, 2016).

Radicais livres derivados de oxigênio, incluindo ânion superóxido, radicais hidroxila, e peróxido de hidrogênio, podem ser liberados de tecidos articulares lesionados levando à clivagem de ácido hialurônico e proteoglicanos. Equinos com doença articular apresentam aumento de radicais livres no líquido sinovial, e a lesão tem sido associada a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição de capacidade antioxidante. O óxido nítrico, outro radical livre, também é produzido por condrócitos osteoartríticos e a superexpressão da sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) em condrócitos osteoartríticos resulta em um excesso de NO. A iNOS é induzida por fatores mecânicos e inflamatórios,

citocinas tais como IL-1β e TNFα e inibição da IL-1β pode reduzir a produção de NO. Além disso, o NO é um indutor de apoptose de condrócitos e quantidades excessivas produzem morte de condrócitos e degradação de matriz (McILWRAITH, 2016).

O fator de crescimento transformador beta (TGF-β) promove a expressão de colágeno tipo II e agrecan e regula negativamente as enzimas que degradam a matriz, contrabalançando a degradação da matriz de cartilagem induzida por IL-β. O efeito do TGF-β é reduzido com o envelhecimento e pode ser responsável pelo nível mais alto de degradação da cartilagem em cartilagem envelhecida em humanos. As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são membros da família de proteínas sinalizadoras TFG-β e estão envolvidas em muitas propriedades fisiológicas e de desenvolvimento. A BMP-2 é regulada positivamente em condrócitos na OA pelas citocinas inflamatórias IL-1β e TNFα, mas a BMP-7 é regulada negativamente em condrócitos osteoartríticos e tem um efeito positivo na biossíntese da matriz (McILWRAITH, 2016).

Em cavalos, a doença articular é atualmente diagnosticada usando métodos clínicos, como o exame musculoesquelético e diagnóstico por imagem; no entanto métodos mais precisos de diagnóstico podem levar à identificação de OA antes que mudanças irreversíveis ocorram dentro dos tecidos articulares. O potencial para tais diagnósticos está disponível em diferentes pesquisas através da mensuração dos níveis marcadores moleculares em produtos de reposição de tecidos. A avaliação de biomarcadores de homeostase e inflamação articular vem produzindo dados animadores e promissores. Ainda que o seu uso na rotina clínica hoje ainda seja inviável, é importante que os profissionais conheçam as possibilidades e limitações dos usos de marcadores (McILWRAITH, 2016).

2.5. Avaliação *in vitro* de condrotoxicidade

Técnicas de cultivo *in vitro* reproduzem modelos simplificados do meio *in vivo*, estes modelos permitem a manipulação experimental de fatores específicos sob condições altamente controladas, circunstâncias muitas vezes inatingíveis em um contexto *in vivo* (STEWART et al., 2000).

Embora a toxicidade sistêmica e tecidual local de diferentes fármacos, inclusive anestésicos locais, sobre cartilagem articular e condrócitos tenha sido evidenciados em diferentes espécies, pouco se sabe sobre os efeitos diretos desses agentes sobre os condrócitos equinos (PARK et al., 2011). Os custos dos estudos com equinos como unidades experimentais e as questões éticas envolvidas reforçam a necessidade de utilizarmos

protocolos de avaliação *in vitro* que permitam obter resultados que reflitam a real necessidade para testes nos animais.

Com esta preocupação, estudos *in vitro* têm sido realizados para avaliar os efeitos dos anestésicos locais na viabilidade de condrócitos utilizando uma variedade de modelos de cultivo (PIPER & KIM, 2008; KAMM et al., 2010; PARK et al., 2011; BAKER & MULHAL, 2012; BREU et al., 2013). Os estudos realizados com condrócitos equinos complementam estudos comparativos sobre semelhanças entre a cartilagem humana e a de outras espécies, permitindo que estas diferenças sejam avaliadas (BAKER & MULHAL, 2012).

A avaliação de condrócitos isolados da matriz é essencial para que haja compreensão da biologia celular da cartilagem e como ela é controlada por eventos físico-químicos (BAKER & MULHAL, 2012), desta forma os cultivos em monocamada podem fornecer informações importantes para compreensão do ambiente articular.

Os condrócitos em cultivo de monocamada, apesar de se dividirem rapidamente, perdem sua característica fenotípica esférica e se tornam células semelhantes a fibroblastos. Esta mudança na morfologia dos condrócitos está associada com a mudança na expressão do colágeno tipo II em cartilagem condrogênica específica em favor da expressão do colágeno tipo I, um colágeno típico de células condrogênicas precursoras. Essa mudança fenotípica dos condrócitos é frequentemente descrita como desdiferenciação *in vitro*. Assim, vários modelos *in vitro* como os sistemas de cultivo tridimensionais (3-D), cultivos em materiais de suporte (*scaffolding*) como agarose, colágeno e alginato, têm sido desenvolvidos para manter o estado diferenciado dos condrócitos num tecido cartilaginoso, imitando as alterações biológicas que ocorrem na cartilagem em crescimento (AHMED, 2007).

A viabilidade celular de condrócitos após exposição a agentes anestésicos locais tem sido avaliada em cultivos em monocamada. Piper & Kim (2008) verificaram, após 30 minutos de tratamento, menor condrotoxicidade da ropivacaína 0,5% quando comparada com bupivacaína 0,5% em cultivos de condrócitos humanos. Também usando condrócitos humanos, Dragoo et al. (2008) observaram necrose celular mais elevada quando houve adição de adrenalina aos anestésicos locais. Portanto, o uso de anestésicos com a mesma concentração, mas com princípios ativo diferentes, associados à adrenalina pode resultar em efeitos deletérios aos condrócitos no ambiente articular.

Em condrócitos equinos, Park et al. (2011) observaram que, em cultivos monocamada e exposição de 30 minutos aos anestésicos, a bupivacaína foi mais tóxica que a lidocaína e a mepivacaína, resultando em viabilidade celular de 29%, 67% e 86%, respectivamente. Breu et

al (2013), usando condrócitos humanos, em concentração idênticas, obtiveram resultados divergentes dos apresentados por Park et al (2011) e demonstraram que a mepivacaína foi mais prejudicial sobre os condrócitos que a bupivacaína 24 horas após o tratamento, contudo após 48 horas a bupivacaína foi mais tóxica. Breu et al. (2013) também avaliaram a toxicidade da ropivacaína, sendo esta considerada menos condrotóxica que a bupivacaína e mepivacaína; após uma e 24 horas de exposição a viabilidade de condrócitos foi de 78% e 16% com bupivacaína 0.5%, 80% em ambos os tempos com ropivacaína 0.75% e 36% e 30% com mepivacaína 2%, respectivamente. Mesmo havendo divergência sobre a toxicidade de fármacos como bupivacaína e mepivacaína em diferentes espécies, estudos mostram que a ropivacaína tem menor potencial condrotóxico em humanos o que desperta a necessidade de trabalhos deste fármaco em condrócitos equinos para avaliar se, nesta espécie, também se apresenta como uma melhor alternativa terapêutica.

A diferença encontrada nos estudos de Park et al. (2011) e Breu et al. (2013) pode ser atribuída à diferença da espécie avaliada, humanos e equinos, à diferença nas técnicas de cultivo, nas formas de avaliação de viabilidade celular e no tempo de exposição aos fármacos. Cabe salientar que estes resultados não são necessariamente um indicativo do que acontece *in vivo*, uma vez que é possível que o dano aos condrócitos seja, no indivíduo, mais limitado pelo fato de estarem imersos em uma matriz extracelular. Contudo, é importante estar ciente das possíveis consequências do uso destes fármacos em pacientes com doenças articulares, onde a cartilagem e os condrócitos serão diretamente expostos a eles.

Por outro lado, para manutenção do perfil fenotípico dos condrócitos vários modelos *in vitro* têm sido propostos, tais como sistemas de cultivo tridimensionais (3-D), cultivos “scaffolding” como agarose, colágeno e alginato. Os cultivos em pellets são de fácil execução e manutenção, não sendo necessário o investimento em matérias de suporte (*scalffold*), além disso, o uso de produtos químicos no sistema de cultura de alginato não é apenas caro, mas também pode alterar o pH do ambiente circundante, afetando o crescimento celular e o metabolismo (AHMED, 2007). Nos cultivos de alginato a coloração da matriz extracelular com azul de toluidina é semelhante à da matriz de alginato, dificultando a distinção entre a matriz dos condrócitos e o alginato (YUNG LEE et al., 2001).

Nos pellets de condrócitos de esterno de frango foram observadas presença de colágeno e agrecan a partir do terceiro dia de cultivo (ZHANG, 2004). Similarmente, Stewart et al. (2000) evidenciaram que, em pellets de condrócitos equinos, os níveis de colágeno tipo II e agrecan aumentaram mais de duas vezes no quarto dia de experimento.

Com o uso de cultivo de explantes (pequenos fragmentos articulares) de articulações humanas, Piper & Kim (2008) evidenciaram que a viabilidade celular caiu para 94% e 78% após 30 minutos de tratamento com ropivacaína e bupivacaína, respectivamente. Não foi observada diferença na viabilidade dos explantes tratados com ropivacaína e solução salina. Breu et al (2013) expuseram explantes de cartilagem humana intactos e osteoartríticos à bupivacaína, ropivacaína e mepivacaína e observaram que as taxas de mortalidade celular foram mais elevadas na cartilagem com OA após tratamento com estes anestésicos, demonstrando que a matriz intacta serve de proteção para os condrócitos e que o uso destes fármacos deve ser cauteloso quando na presença de danos na cartilagem. Portanto, existem indícios de que alguns agentes anestésicos causem efeitos deletérios aos condrócitos associados principalmente à concentração do fármaco e ao estado fisiológico da articulação.

2.6. Avaliação *in vivo* de condrotoxicidade

Embora estudos *in vitro* forneçam um ambiente controlado em cultivos padronizados, muitas influências *in vivo* são perdidas. Especificamente, estudos *in vitro* não permitem a depuração de metabolitos de envolvimento local ou metabolismo sistêmico de medicamentos administrados. Portanto, os resultados podem não representar o que ocorreria em uma situação *in vivo* (SCHAEFER et al., 2009). No caso de administração IA de medicações *in vivo*, os fármacos são filtrados e os mecanismos de tamponamento são ativos (BOLT et al., 2008). Portanto, quando as drogas são injetadas IA, ocorre diluição potencial e a duração da exposição e a concentração da droga podem variar (MANCINI et al., 2017).

Avaliações clínicas de manifestações tóxicas de fármacos IA nos equinos podem ser realizadas através da avaliação da claudicação, palpação regional, presença de calor, redução do ângulo de flexão da articulação e fazem parte fundamental da avaliação de toxicidade (POZZOBON et al, 2009; SANTOS et al, 2009).

Nicholson et al. (2010) propuseram um sistema para avaliação de lesões osteocondrais nas radiografias atribuindo escores a variáveis que refletem alterações sinoviais, dano da cartilagem e fragmentos osteocondrais. Neste estudo, as radiografias das articulações afetadas foram avaliadas quanto ao estreitamento do espaço articular, presença de osteófitos (número e tamanho), entesófitos (número e tamanho), fragmentos osteocondrais (número e tamanho), alterações ósseas subcondrais (esclerose e radioluscência) e edema dos tecidos moles atribuindo uma pontuação de 0 a 3 a cada parâmetro onde 0 indica ausência de lesão e 3 lesão

grave. A metodologia se mostrou eficiente para quantificar lesões em cavalos de corrida de diferentes idades.

Muitos estudos têm utilizado biomarcadores para avaliar a lesão de OA experimental em cavalos. Mudanças no metabolismo da cartilagem podem ser mensuradas a partir do soro, líquido sinovial e até urina (CAMPEBELL et al., 2004; SANTOS et al., 2009; KAMM, 2010; PIAT et al., 2012).

A artroscopia é considerada o padrão ouro na avaliação da cartilagem articular, pois permite a visualização direta da cartilagem protegida dentro do ambiente articular, mas o uso de diferentes sistemas de graduação pelos investigadores dificulta a comparação precisa de resultados. Já imagens radiográficas de alterações da cartilagem articular muitas vezes são pobremente definidas e, alterações que não os fragmentos osteocondrais, não são visualizados até atingir estágios mais avançados da doença (NICHOLSON et al., 2010).

Para identificar os mediadores inflamatórios envolvidos na OA equina, Kaam et al. (2010) utilizaram a avaliação da expressão gênica, ELISA e histologia de fragmentos de carpo com e sem a presença de OA. Eles observaram que a expressão dos genes do TNFα e de MMP-13 estavam aumentados tanto na sinóvia quanto na cartilagem; ADAMTS-5 aumentado na sinóvia e IL-1ß e ADAMTS-4 aumentados na cartilagem de articulações com OA. Da mesma forma, a concentração de TNFα estava significativamente aumentada no fluido sinovial das articulações com OA. O aumento de TNFα na sinóvia e cartilagem sugere que ele pode não só causar danos à cartilagem, mas também levar a um aumento na secreção de outras citocinas pela sinóvia, visto que MMP-13 é um mediador regulado por TNFα.

Após administração única de bupivacaína e lidocaína nas articulações intercarpiana e tibiotarsiana, Piat et al. (2012) observaram diferença significativa nos níveis de agrecan e colágeno tipo II quando comparados a administração IA de solução fisiológica nas amostras obtidas 6, 12, 24, 48 horas, 7 e 14 dias após administração.

Após sinovite induzida por LPS na articulação intercarpiana de equinos Campebell et al. (2004) observaram que a lidocaína não impediu o aumento do volume de líquido sinovial, da concentração de proteína, da resposta leucocitária e aumento da síntese e liberação de TNF-α. Ou seja, localmente a lidocaína não se mostrou um fármaco com atividade anti-inflamatória. Por outro lado, também utilizando LPS como agente inflamatório para induzir uma sinovite experimental, Santos et al. (2009) avaliaram a duração do efeito analgésico e anti-inflamatório da ropivacaína IA e observaram diminuição na contagem de células nucleadas, possivelmente associada à ativação dos canais da adenosina mitocondrial trifosfato potássio sensitiva na sinóvia pelo radical amida da ropivacaína.

Considerando-se os trabalhos anteriores, a ropivacaína tem se mostrado como uma alternativa menos tóxica em humanos o que motiva o interesse para o seu uso IA em equinos. O presente projeto se propõe a avaliar em condições laboratoriais e, posteriormente, no uso clínico em animais os possíveis efeitos deletérios da administração de uma única aplicação de ropivacaína na articulação tibiotarsiana de pôneis. Espera-se que o modelo adotado forneça dados sobre a toxicidade e no processo da ação inflamatória, possibilitando incluir a ropivacaína como agente anestésico validado para vários procedimentos que são realizados na rotina da medicina equina.

2.7. Avaliação de fatores inflamatórios por qPCR

Nas análises de biologia molecular o RT-PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é o método de escolha para monitorar alterações de padrões de expressão gênica em condrócitos. O qPCR é uma das ferramentas analíticas mais poderosas para a quantificação sensível e precisa dos níveis de expressão de mRNA em células de diferentes populações ou sob diferentes condições de cultura. Um dos principais desafios encontrados na interpretação de dados do qPCR é a seleção de uma estratégia de normalização apropriada. A normalização dos dados é necessária para controlar o erro experimental introduzido durante o processo de vários estágios de isolamento e processamento de RNA. Diferentes opções variam desde a padronização do peso do tecido ou do número de células até o uso de moléculas artificiais incorporadas nas amostras (TOEGEL et al., 2007).

Para fazer comparações precisas de resultados de PCR quantitativos em tempo real os níveis de expressão dos genes de interesse devem ser normalizados através de um gene de referência (ou constitutivo) (*housekeeping*) (TOEGEL et al., 2007; McCULLOCH et al., 2012). O uso de genes de referência com níveis de expressão presumivelmente estáveis sob uma variedade de condições experimentais é o método mais popular para o controle interno do erro de dados do qPCR. Uma vez que vários estudos demonstraram o potencial de regulação desses genes de referência pelas condições do bioensaio, instituiu-se que a validação de genes de referência para cada situação experimental é um requisito crucial para a aquisição de dados biologicamente significativos. Neste contexto, quando um gene de referência validado é usado para normalizar dados de qPCR, os resultados podem ser significativamente diferentes dos obtidos quando um gene de referência não validado é usado (TOEGEL et al., 2007).

Os genes de referência, teoricamente, representam uma maneira conveniente de normalizar os dados do qPCR, uma vez que pode ser o controle para todas as etapas da análise de expressão gênica. No entanto, a qualidade dos dados de expressão quantitativa normalizada não pode ser melhor do que a qualidade do próprio normalizador. Qualquer variação no normalizador obscurecerá mudanças reais e produzirá erros adicionais. Portanto, a estabilidade do gene de referência de escolha representa o ponto de referência para a resolução do ensaio qPCR e influencia diretamente nos resultados (TOEGEL et al., 2007).

Uma variedade de genes tem sido utilizada como *housekeeping* em estudos de cartilagem em várias espécies. Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) tem sido usado como um gene de referência em estudos de cartilagem articular humana, bovina, suína e caprina, incluindo amostras normais e com OA (McCULLOCH et al., 2012). Da mesma forma, Warapu et al. (2007), avaliando cartilagens bovinas, afirmam que o GAPDH é um gene de referência apropriado para comparações dentro de cada zona de condrócitos, contudo não deve ser utilizado para áreas entre as zonas. Corroborando com estes dados McCulloch et al. (2012) verificaram que GAPDH, flavoproteína de succinato desidrogenase, subunidade A, peptidilprolyl isomerase e beta-actina são genes de referência estáveis na espécie suína.

Contudo alteração nos níveis de expressão de alguns genes de referência pode ser observada pelos tratamentos a que estas células são expostas, como por exemplo, Toegel et al. (2007) que observaram após tratamento de condrócitos humanos com agentes condroprotetores que os genes mais estáveis nas células tratadas com glucosamina foram *GAPDH*, *B2M* (Beta-2-microglobulina) e *SDHA*, nos tratamentos com curcumina e diacereína os genes mais estáveis foram *HPRT1*, *GAPDH* e *B2M*. Diferentemente, Pombo-Suarez et al. (2009) avaliaram genes de referência na cartilagem humana com OA avançada e observaram que os genes de referência mais estáveis foram TATA *box binding protein* (TBP), proteína ribossômica L13a (Rpl13a) e b2m, os genes menos estáveis foram *GAPDH*, beta actina e 18s ribossomal (18s). Em estudo com cartilagens normais e OA de cães Ayers et al. (2007) identificaram *Rpl13a* e succinato desidrogenase como os genes de referência mais estáveis.

Segundo McCulloch et al. (2012) TBP, Rpl4 (que é semelhante em função de rpl13a), e beta2microglobulina apresentaram baixa estabilidade como genes de referência em cartilagens suínas (McCULLOCH et al., 2012). Estes dados diferem de Al-sabah et al. (2016) que observaram que succinato desidrogenase, YWHAZ e RPL4 foram mais estáveis que gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) em sistemas de explantes de cartilagens. Este afirma que como GAPDH é uma enzima envolvida na glicólise, não é surpreendente que sua transcrição altere

em resposta à carga mecânica, o que coloca demandas metabólicas adicionais sobre as células (AL-SABAH et al., 2016).

A normatização e padronização dos genes de referência para cada espécie ainda estão em estágios iniciais de avaliação, principalmente em equinos, espécie na qual faltam estudos de padronização e comparação de genes de referência para avaliação de cartilagem.

Na espécie equina, devido à ausência de um gene de referência padrão, os genes mais utilizados são: 18S (KAMM et al., 2010), proteína ribossomal 40 S S23 (RP-S23) (AHMED et al., 2007a), *Gapdh* (LETTRY et al., 2010; RUBIO-MARTÍNEZ et al., 2017), beta-actina (LETTRY et al., 2010) e ubiquitina (DAVI et al., 2002). Curiosamente, boa parte dos estudos com cartilagens de cavalos optam por utilizar apenas um gene de referência (AHMED et al., 2007; DAVI et al., 2002; KAMM et al., 2010; RUBIO-MARTÍNEZ et al., 2017), diferentemente do recomendado por McCulloch et al. (2012) que sugerem o uso de 3 ou 4 *housekeepings*, visto que fornece um número realista de genes de referência e adequada normalização dos resultados.

O uso de técnicas de avaliação de biologia molecular, principalmente qPCR, vem gerando resultados precisos e sensíveis na avaliação de cartilagem e acompanhamento de OA. Novas pesquisas devem ser realizadas para o reconhecimento dos estados fisiológicos da articulação e patológicas da doença articular, a partir destes resultados avaliações terapêuticas podem ser realizadas com um foco específico.

2.8. Biomarcadores

O metabolismo normal ou anormal dos tecidos pode ser descrito pelo uso de biomarcadores, estes marcadores são moléculas de produtos normais e subprodutos dos processos metabólicos que ocorrem dentro do tecido esquelético. Na doença articular, quando cartilagem articular, meniscos, ligamento ou membrana sinovial estão envolvidos, essas moléculas podem ser liberadas no líquido sinovial. A capacidade de identificar e medir essas moléculas marcadoras no líquido sinovial, soro e urina oferece aos pesquisadores e clínicos a oportunidade de usá-los como biomarcadores da doença articular (McILWRAITH, 2016).

Atualmente o diagnóstico de doença articular em cavalos é realizado através de exames clínicos e complementares, como por exemplo, exame radiológico (FRISBIE et al., 2016). Contudo, nas fases iniciais de OA, pode ocorrer degeneração da cartilagem mesmo quando a aparência radiológica articular é normal (BRAMA et al., 1998) e, nestas situações, o

uso de marcadores bioquímicos mensurados em estágios iniciais de degeneração articular podem prover informações úteis aos clínicos para avaliar a integridade da cartilagem antes que mudanças irreversíveis ocorram na articulação (BRAMA et al., 1998; BAUER et al, 2006; FRISBIE et al., 2016).

Marcadores moleculares de produtos do metabolismo da cartilagem podem atuar como biomarcadores. Sabe-se que as alterações iniciais de degeneração articular podem ser assintomáticas por anos e o uso de biomarcadores permite monitorar a doença e sua resposta a tratamento. Trabalhos com biomarcadores de cartilagem e inflamação articular em humanos e equinos tem resultados promissores (FRISBIE et al., 2016).

O grupo de estudos de definições de biomarcadores define um biomarcador como uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. Os biomarcadores podem ser parâmetros anatômicos, fisiológicos, bioquímicos ou moleculares associados à presença e gravidade de doenças específicas e são detectáveis por uma variedade de métodos, incluindo exame físico, exames laboratoriais e de imagem (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP, 2001).

Os marcadores moleculares podem ser diretos ou indiretos. Os marcadores moleculares diretos refletem especificamente processos anabólicos ou catabólicos e podem ser usados como medidas de síntese ou decomposição de tecidos, marcadores de cartilagem são oriundos de estruturas ósseas / cartilaginosas e enzimas que atuam apenas nestes tecidos (McILWRAITH, 2005; FRISBIE et al., 2016). Exemplos de marcadores anabólicos diretos da homeostase articular incluem propeptídeo carboxi do colágeno tipo II, sulfato de condroitina e epítopo CS-846; enquanto marcadores catabólicos diretos incluem marcadores de clivagem de colágeno e peptídeos de fibrina (FRISBIE et al., 2016).

Por outro lado, os marcadores bioquímicos indiretos, que não são gerados no processo de síntese ou degradação tecidual, mas afetam o *turnover* dos tecidos, incluem moléculas como citocinas, mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e enzimas que são liberadas com trauma e processos inflamatórios. Estes marcadores podem fornecer informações sobre o ambiente intra-articular que não são obtidas apenas com a avaliação de marcadores diretos (McILWRAITH, 2005; FRISBIE et al., 2016).

Dependendo do tipo de amostra onde são medidos, tais marcadores podem ser vistos como indicativo do grau de desequilíbrio homeostático articular no momento da amostragem e pode representar contribuições de vários eventos e fontes de tecidos (cartilagem, osso e sinóvia) (FRISBIE et al., 2016).

BAUER et al. (2006) propuseram um esquema de classificação de biomarcadores para OA incluindo cinco categorias: diagnóstico (aqueles que podem distinguir com segurança indivíduos afetados pela OA e saudáveis), impacto da doença (marcadores que podem ser usados para avaliar gravidade e estágio da doença), prognóstico (marcadores que têm relação com o prognóstico em indivíduos com OA ou que possam determinar o risco de doença), eficácia da intervenção (marcadores que podem ser usados para monitorar resposta ao tratamento farmacológico) e investigação (marcadores para o qual um papel no processo da doença é provável, mas que ainda não estão suficientemente comprovados para serem incluídos).

Atualmente nenhum marcador isolado pode ser classificado como diagnóstico para OA em estágio inicial, seja em humanos ou animais. Embora a pesquisa em OA humana tenha gerado informações sobre estágio e prognósticos, marcadores investigativos ainda estão sendo avaliados em nível experimental. Isto também é verdade na pesquisa de biomarcadores de OA em equinos onde a investigação a longo prazo e resultados de doenças clínica são escassos. A importância de biomarcadores na doença articular equina é de fundamental importância para o diagnóstico precoce da doença, esclarecimento de processos patológicos bem como medidas para monitoramento e resposta a tratamentos (FRISBIE et al., 2016).

Para monitorar o status da doença em indivíduos com OA, múltiplos biomarcadores são necessários, com o painel refletindo alterações anabólicas e catabólicas, bem como o estado inflamatório da articulação. O ideal é que marcadores anabólicos e catabólicos sejam mensurados em uma mesma amostra, e de preferência de forma seriada, para que os resultados sejam analisados em conjunto para refletir um quadro mais abrangente do estado de saúde da cartilagem (FRISBIE et al., 2016).

As alterações estruturais nos tecidos articulares (perda de cartilagem, alterações ósseas subcondrais) são pouco correlacionadas aos sintomas clínicos da doença e, em parte, essa disparidade pode ser causada pela importante contribuição da inflamação ativa. Neste caso a mensuração de marcadores inflamatórios indiretos (enzimas, citocinas, mediadores e enzimas) determinam com maior precisão os marcadores de doença, prognóstico e eficácia do tratamento, sendo que estes constituem potenciais moléculas alvo para a intervenção terapêutica (FRISBIE et al., 2016).

Até o momento são limitados, ainda que promissores, os dados sobre o uso de biomarcadores no diagnóstico e monitoramento de doenças articulares em equinos. Painéis de alguns biomarcadores foram validados em OA equina experimental, e o status de biomarcadores foi revista em 2005 (McILWRAITH, 2005) e, mais recentemente, em 2015

(FRISBIE et al., 2016). Para diagnóstico e tratamento precoce de doenças articular em equinos estes métodos diagnósticos não invasivos, reprodutíveis, com especificidade e sensibilidade para as fases iniciais de OA são imprescindíveis (McILWRAITH et al., 2018). Contudo, Mas um obstáculo importante para o progresso na pesquisa de biomarcadores tem sido a relação complexa entre a produção de um marcador candidato no local alvo (isto é, dentro da articulação) e a concentração medida em fluidos corporais a uma distância deste local (sérica) (FRISBIE et al., 2016).

Em conclusão, o campo dos biomarcadores para pesquisa vem produzindo dados promissores, ainda que a implementação desses dados na rotina clínica ainda seja inviável. Até que isso aconteça, é importante que os profissionais conheçam as possibilidades e limitações destes biomarcadores tanto na investigação de doença quanto na resposta ao tratamento (FRISBIE et al., 2016).

3. ARTIGO 1

Trabalho aceito para publicação:

Viability of equine chondrocytes after exposure to mepivacaine and ropivacaine *in vitro*

Gabriele Biavaschi Silva, Flávio D De La Côrte, Karin E Brass, Heloisa Einloft Palma, Miguel Gallio, Camila Cantarelli, Kalyne Bertolin, Alexandre Krause, Julien Wergutz, Luciana Maria Fontanari Krause, Alfredo Quites Antoniazzi

JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE, 2019

Journal of Equine Veterinary Science 77 (2019) 80–85

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Equine Veterinary Science

journal homepage: www.j-evs.com

Original Research

Viability of Equine Chondrocytes After Exposure to Mepivacaine and Ropivacaine In Vitro

Gabriele Biavaschi Silva [a,*], Flávio D. De La Côrte [a], Karin E. Brass [a], Heloisa Einloft Palma [b], Miguel Gallio [c], Camila Cantarelli [a], Kalyne Bertolin [a], Alexandre Krause [d], Julien Wergutz [e], Luciana Maria Fontanari Krause [e], Alfredo Quites Antoniazzi [a]

[a] Department of Large Animal Clinics, School of Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil
[b] Department of Small Animal Clinics, School of Veterinary Medicine, University of Cruz Alta, Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil
[c] Department of Large Animal Clinics, School of Veterinary Medicine, Instituto de Desenvolvimento Educacional do Alto Uruguai, Getúlio Vargas, Rio Grande do Sul, Brazil
[d] Department of Small Animal Clinics, School of Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil
[e] Health Department, School of Biomedicine, Universidade Franciscana, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 December 2018
Received in revised form
26 February 2019
Accepted 26 February 2019
Available online 6 March 2019

Keywords:
Horse
Anaesthesia
Chondrocyte
Ropivacaine
Mepivacaine
Intra articular

ABSTRACT

Chondrocyte health is altered when exposed to local anesthetics, raising concerns as to the long-term effects of local anesthetics intra-articularly for diagnosis and analgesia. To investigate the drug with the lowest toxic potential, the effect of ropivacaine and mepivacaine on chondrocytes was evaluated. Articular cartilage from normal metacarpophalangeal joints of five equine cadaver specimens was used to establish chondrocyte cultures. Following seven days, chondrocytes were exposed to standard culture medium (DMEM), ropivacaine 7.5 mg/ml (ROP7.5), ropivacaine 10 mg/ml (ROP10), mepivacaine 20 mg/ml (MEP20), mepivacaine 30 mg/ml (MEP 30), and 0.9% saline solution (SAL). Chondrocyte viability was evaluated by trypan blue exclusion, MTT, and flow cytometry via cellular staining with propidium iodide. No differences were observed between treatments following trypan blue exclusion assay. A difference was observed between DMEM and all other treatment groups ($P < .0001$) with a significant viability drop using the MTT assay. Mepivacaine 20 mg/ml and MEP30 exposure between showed greatest decrease in cellular viability compared to SAL, ROP7.5, and ROP10 ($P < .0001$). Cellular viability decreased as measured by flow cytometry in all groups compared to DMEM and ROP7.5 ($P < .02$). Interestingly, the trypan blue, MTT, and flow cytometry assays yielded different results. Although there was no difference using trypan blue, MTT demonstrated that ropivacaine-treated cells had lower viability than DMEM, and cytometry found that ROP7.5 did not differ from DMEM. Results in vitro suggest that short-term exposure to ropivacaine may result in less chondrotoxicity than mepivacaine. *In vivo* studies are warranted investigating long-term effects of local anesthetics on equine articular cartilage.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Joint injury and disorders represent a major part of the workload of equine practitioners and, in most cases, cartilage damage has been identified as an important contributing factor [1]. The use of local anesthetics in a multimodal approach to analgesia continues to gain popularity to manage joint pain. Although often used for diagnostic purposes, further controlled, blinded studies are necessary to determine the actual benefit of this pre-emptive treatment.

Local anesthetics are routinely used in the diagnosis of lameness in horses [2] and, intra-articular (IA) injection is a common procedure for postoperative analgesia [3]. There are few studies evaluating the effect of local anesthetics on the viability rates of equine chondrocytes, this should be the start point in the evaluation of IA effects of certain drugs. Local anesthetics act by blocking the conduction of sensory neurons, retarding the influx of Na^+ ions into the

Animal welfare/ethical statement: This study was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) (protocol number CEUA 7193301116).
Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest.

* Corresponding author at: Gabriele Biavaschi Silva, University Veterinary Hospital, Department of Large Animal Clinics, Federal University of Santa Maria, Roraima Avenue, 1000 - Camobi, 97105900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.
E-mail address: gabibiavaschi@hotmail.com (G.B. Silva).

https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.02.019
0737-0806/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

cells [4,5]. Mepivacaine is the most frequently used local anesthetic agent for IA injection in equine practice worldwide [4,6–9]; however, longer-acting local anesthetics such as ropivacaine or bupivacaine have been recommended for postoperative analgesia [10]. Ropivacaine, as such would be an interesting alternative for use in horses because human chondrocytes show less chondrotoxicity to this drug [10].

Investigations of potential toxic effects of local anesthetics has increased after reports of glenohumeral chondrolysis in humans after arthroscopy followed by infusion of bupivacaine into the joint [3,11]. There are few studies evaluating the viability of equine chondrocytes after exposure to certain drugs [6,12,13]. Some studies on chondrotoxicity of local anesthetics have been carried out in the bovine [14,15], human [10,16], and equine species providing evidence of disruption of articular cartilage homeostasis and some degree of toxicity [3]. The results of previous investigations in different species have demonstrated that bupivacaine, among other local anesthetics, had the greatest toxic potential to the chondrocytes [6,10,16]. On equine chondrocytes, mepivacaine presented lower chondrotoxicity than lidocaine and bupivacaine [6]. On human chondrocytes, ropivacaine had lower toxicity than bupivacaine [10] and mepivacaine [16]. Limited studies are available evaluating ropivacaine, which seems to be safer than all the other local anesthetics; however, its use has not been evaluated in horses.

The objective of this study was to investigate the effects of short-term exposure of equine chondrocytes to a commonly used local anesthetic, mepivacaine hydrochloride (20 and 30 mg/mL), on chondrocyte viability compared with exposure to a less common, but possibly less toxic, local anesthetic, ropivacaine hydrochloride (7.5 and 10 mg/mL). Study results may aid practitioner's selection of local anesthetics for IA use.

2. Materials and Methods

2.1. Primary Culture of Equine Chondrocytes

The limbs used in this experiment were obtained from a slaughterhouse (Foresta Inc). Most of the slaughtered horses had no defined breed, so the age was estimated. Whenever possible, specimen donor horses that still showed incisor eruptions (less than 5 years of age) were selected. Once harvested, the limbs were kept refrigerated in thermal boxes for up to 5 hours, during transportation to the laboratory.

At the laboratory, and before cell harvesting, all joints were evaluated to ensure that there was no gross evidence of preexisting damage or cartilage degeneration such as softening, discoloration, fibrillation, or fissuring. The same evaluator performed the cartilage evaluations. To harvest cartilage tissue, the limb was disarticulated at the fetlock joint and the cartilage grossly examined. Cartilage was collected from the region of the condyles, sagittal ridge, and first phalanx.

Briefly, the cartilage was isolated and processed under sterile conditions according to Park et al. Chondrocytes were obtained after cartilage digestion with 1% pronase (Roche, Germany) for 90 minutes at 37°C and 0.4% collagenase (Sigma Aldrich, MO, EUA) for three hours at 37°C. The reaction was stopped by adding phosphate buffered saline (GIBCO, NY, EUA) supplemented with 5% fetal bovine serum (Invitrogen, CA, EUA) and 1% penicillin/streptomycin/glutamine (Invitrogen, CA, EUA). After enzymatic digestion, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, NY, EUA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin/glutamine, and phenol red was used to resuspend cells for culture.

Before plating chondrocytes, an estimate of the chondrocyte number and viability was determined using a Neubauer's hemocytometer and the trypan blue exclusion test. Viability rates after extraction of cartilage chondrocytes were all 98% or higher. Chondrocytes were transferred to cell culture bottles containing a chondrogenic medium and incubated at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2. The culture medium was changed every 2 or 3 days, when there was acidification of the medium identified by color change. After approximately 15 days, once 80% confluence was obtained, the culture bottles were washed with 10% trypsin solution (Sigma Aldrich, MO, EUA) for 10 minutes. Subsequently the contents were transferred to conical tubes and centrifuged, the supernatant was removed and the pellet eluted into a chondrogenic medium. Cells were transferred into six-well cell culture plates at a density of 25×10^4 cells/well. For the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, 8×10^3 cells/well were seeded in a 96-well plate. After an average period of 7 days, when around 80% confluence was reached in the culture dishes, cell treatments started.

Equine chondrocytes of the first passage were used in the various assays; each independent experiment, comparing treatments, was performed with the use of cartilage obtained from a single donor to reduce individual variability of cartilage source. The chondrocyte cultures obtained from five different horses were subjected to the trypan blue exclusion and flow cytometry in a biological quintuplet; MTT was performed in biological quintuplet and experimental triplicate.

2.2. Experimental Groups

Equine chondrocytes were allocated to six treatment groups. The culture medium was removed and the treatments applied for 30 minutes. In the DMEM group, the medium was changed and the cells were incubated for an additional 30 minutes. The pH of all treatments were predominantly acidic, being ropivacaine 7.5 mg/mL 5.4, ropivacaine 10 mg/mL 5.3, saline 5.8, mepivacaine 20 mg/mL 5.9, and mepivacaine 30 mg/mL 5.9. To mimic the clinical use of these local anesthetics, the treatments were performed without correction of pH or preservative-free solutions. The groups were set as follows:

Culture medium (negative control medium): DMEM.
Ropivacaine 7.5 mg/mL (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, SP, Brazil): ROP7.5.
Ropivacaine 10 mg/mL (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, SP, Brazil): ROP10.
0.9% normal saline solution (negative control saline) (Halex Istar, GO, Brazil): SAL.
Mepivacaine 20 mg/mL (Nova DFL Indústria e Comércio S.A., RJ, Brazil): MEP20.
Mepivacaine 30 mg/mL (Nova DFL Indústria e Comércio S.A., RJ, Brazil): MEP30.

2.3. Cell Viability Tests

2.3.1. Trypan Blue Exclusion Assay

After 30 minutes of exposure to the anesthetics, the treatment was removed and cells were washed with 10% trypsin solution for 10 minutes. Subsequently, the contents were transferred to conical tubes and centrifuged, the supernatant was removed and the pellet eluted into chondrogenic medium. The cells from each group were stained with 0.4% trypan blue (Sigma Aldrich, MO, EUA) for 5 minutes. The number of dye-excluding (live) cells and positively stained (dead) cells was determined using a Neubauer's chamber, and results were expressed as percentages.

2.3.2. MTT Assay

Cell viability was also determined using the MTT colorimetric assay in triplicate. Chondrocytes were seeded into 96-well plates, at a density of 8×10^3 cells/well, and incubated for 7 days in a humidified 5% CO_2 incubator at 37°C. Culture medium was changed when acidification of the cell culture medium occurred. Then, the culture media was removed and 100 μL of the treatment agents were added to each well. After a 30 minutes exposure, the treatment solution was replaced with 100 μL of DMEM and 10 μL of MTT reagent. After 3-hour incubation, the 96-well plate was emptied and 100 μL of dimethyl-sulfoxide added to each well to dissolve the formazan crystals. The optical density (OD) was measured at 570 nm using a spectrophotometer (Fisher Bio-Tek BT2000) and the optical densities were converted into percentages using the following formula:

Cell viability (%) = OD sample/OD negative control × 100.

2.3.3. Flow Cytometry

For the flow cytometric detection of cell damage, equine chondrocytes were labeled with propidium iodide (PI). When the chondrocyte membrane loses its ability to exclude cationic dyes, such as PI, the dye can easily penetrate the membrane and stain the cell nucleus. The dye is then detected by laser flow cytometry. The test was carried on 6-well plates as described. After 30 minutes of treatment, cells were trypsinized, centrifuged, and resuspended in phosphate buffered saline. Samples were incubated with 50 μg of PI at 37°C for 40 minutes. In aqueous solution, the PI has excitation/emission maxima of 493/636 nm. Once the dye is bound, its fluorescence is enhanced 20- to 30-fold, the fluorescence excitation maximum is shifted ~30–40 nm to the red and the fluorescence emission maximum is shifted ~15 nm to the blue, resulting in an excitation maximum at 535 nm and fluorescence emission maximum at 617 nm. The percentage of PI-stained cells in each treatment group was calculated using the FACSuite software (BD Biosciences).

2.4. Statistical Analysis

Data were transformed into sine arc using the formula ASEN (SQUARE ROOT [%]). Cell viability results are represented as mean ± standard deviation. Significant differences in cell viability were determined using one-way ANOVA followed by Tukey test. A value of $P < .05$ was considered significant. All data were processed using GraphPad Prism 6.

3. Results

3.1. Trypan Blue Exclusion Assay

In the evaluation of nonstained cells with trypan blue, the viability rates varied between 55.6% and 100%; however, no differences were observed between treatments. Mean cellular viability of equine chondrocytes as measured by trypan blue exclusion were 94.9 ± 9.7% for DMEM, 94.7 ± 3.5% for SAL, 86 ± 7.7% for ROP7.5, 81 ± 19.1% for ROP10, 94.9 ± 4.4% for MEP20, and 89.6 ± 6% for MEP30 (Table 1; Fig. 1).

3.2. MTT Assay

Cellular viability of equine chondrocytes as measured by the MTT assay was 100% for DMEM, 50.5 ± 7.4% for SAL, 48.9 ± 2.2% for ROP7.5, 45.4 ± 2.0% for ROP10, 30.2 ± 3.1% for MEP20, and 23 ± 3.1% for MEP30 (Fig. 2). Treatment with DMEM maintained cellular viability but a significant decrease in cellular viability was observed after treatment with SAL, ROP7.5, ROP10, MEP20, and MEP 30 when compared to DMEM ($P < .0001$). Chondrocytes treated with MEP20 and MEP30 showed significantly decreased cellular viability compared with ROP7.5, ROP10, and SAL, as well as DMEM ($P < .0001$) (Fig. 2).

Table 1
Chondrocyte viability with trypan blue assay, MTT, and flow cytometry treated with ropivacaine 7.5 mg/mL, ropivacaine 10 mg/mL, saline, mepivacaine 20 mg/mL, and mepivacaine 30 mg/mL.

Treatment	Trypan Blue	MTT	Flow Cytometry
Culture medium (DMEM)	94.9 ± 9.7%	100%[a]	99.4% ± 1.0%[a]
Ropivacaine 7.5 mg/mL	86 ± 7.7%	48.9 ± 2.2%[b]	97.4 ± 1.3%[a]
Ropivacaine 10 mg/mL	81 ± 19.1%	45.4 ± 2.0%[b]	95.8 ± 3.8%[b]
0.9% normal saline solution	94.7 ± 3.5%	50.5 ± 7.4%[b]	99.1 ± 0.3%[b]
Mepivacaine 20 mg/mL	94.9 ± 4.4%	30.2 ± 3.1%[c]	96.1 ± 2.6%[b]
Mepivacaine 30 mg/mL	89.6 ± 6%	23 ± 3.1%[c]	95.2 ± 3.0%[b]

Values with different letters that are within the same column are significantly different ($P < .05$).

3.3. Flow Cytometry

Chondrocyte viability as measured by fluorimetric staining with propidium iodide and using flow cytometry was 99.4% ± 1.0% for DMEM, 99.1 ± 0.3% for SAL, 97.4 ± 1.3% for ROP7.5, 95.8 ± 3.8% for ROP10, 96.1 ± 2.6% for MEP20, and 95.2 ± 3.0% for MEP30 (Fig. 3). Chondrocyte treatment with DMEM and ROP7.5 maintained cellular viability, whereas treatment with SAL, ROP10, MEP20, and MEP30 caused decreases in cellular viability ($P < .02$) (Fig. 3).

4. Discussion

Findings presented by the MTT indicated that deleterious effects of ropivacaine can be less intense than that of mepivacaine on chondrocyte cell cultures after a 30-minute exposure to the anesthetics. This is an important result and must be taken in account when choosing the local anesthetic to be used in IA blocks (during lameness evaluations) and postoperative analgesia, after arthroscopic surgery, where there may be cartilage damage and chondrocyte exposure may occur. If there is chondrocyte death, owing to its limited replication ability, the maintenance of the extracellular matrix (ECM) that has chondroprotective function changes [17]. In osteoarthritic joints, the superficial layer of cartilage is removed

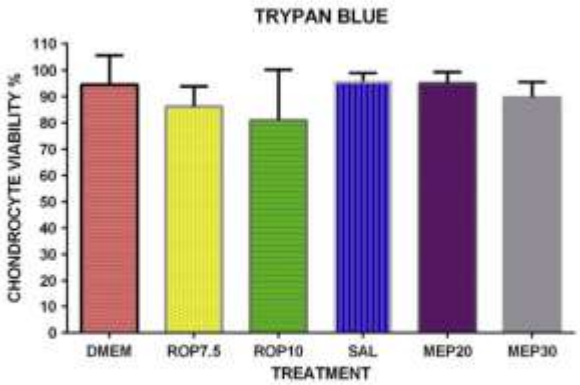

Fig. 1. Viability of equine chondrocytes as measured by trypan blue exclusion after exposure to standard culture medium (DMEM), ropivacaine 7.5 mg/mL (ROP7.5), ropivacaine 10 mg/mL (ROP10), 0.9% saline (SAL), mepivacaine 20 mg/mL (MEP20), and mepivacaine 30 mg/mL (MEP30).

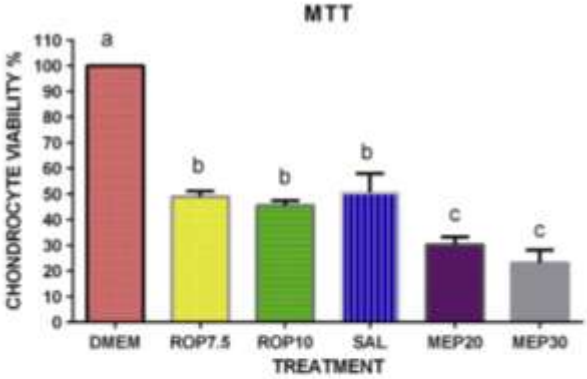

Fig. 2. Viability of equine chondrocytes as measured by MTT assay after exposure to standard culture medium (DMEM), ropivacaine 7.5 mg/mL (ROP7.5), ropivacaine 10 mg/mL (ROP10), 0.9% saline (SAL), mepivacaine 20 mg/mL (MEP20), and mepivacaine 30 mg/mL (MEP30). Graphs with different letters are significantly different ($P < .05$).

and gradual destruction of ECM with resulting chondrocyte exposure is observed [16]. Therefore, any substance administered IA can cause chondrocyte death and accelerate the osteoarthritic process [17]. In these cases, there will be a direct exposure of chondrocytes to local anesthetics and the choice of a less aggressive drug, such as ropivacaine, should be taken into consideration because loss of articular cartilage increases the diffusion potential of local anesthetics [16].

Standardization of pH samples or isolation of the preservation media was not performed in this study to mimic the use of local anesthetics as it is used in the field. The local anesthetics used in this study had a pH between 5.3 and 5.9; as stated by Lo et al., these solutions are commonly stored and used at an acidic pH. It is known that the mechanism of toxicity of local anesthetics may be related to their acidic pH and stabilizing solutions added to the drugs may decrease this toxicity [10]. However, pH differences did not influence chondrocyte viability; treatments with ropivacaine (ROP7.5 and ROP10) had lower pH values and higher cell viability than did mepivacaine (MEP20 and MEP30), which presented higher pH. The literature shows that normal human fibroblasts have a well-defined optimum pH for growth in the alkaline range, varying from 7.4 to 7.8 [18] and cells exposed to acidic stress are known to suffer changes in cell metabolism and cell function, with these changes

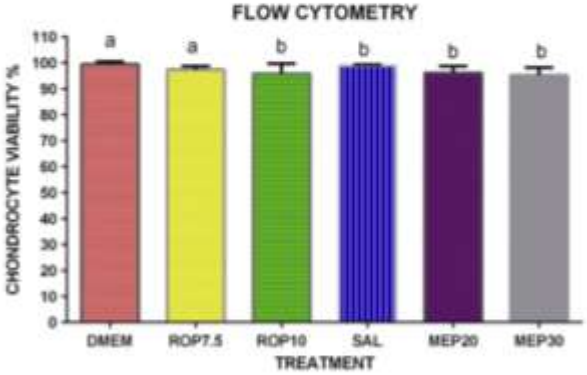

Fig. 3. Viability of equine chondrocytes as measured by propidium iodide staining and flow cytometry after exposure to standard culture medium (DMEM), ropivacaine 7.5 mg/mL (ROP7.5), ropivacaine 10 mg/mL (ROP10), 0.9% saline (SAL), mepivacaine 20 mg/mL (MEP20), and mepivacaine 30 mg/mL (MEP30). Graphs with different letters are significantly different ($P < .05$).

possibly leading to a decreased cell viability. Thus, it is possible that the acidity of the carrier solution itself and not the active local anesthetic was cytotoxic [15]. Continuous infusion of solutions with a pH <5 appears to be toxic to chondrocytes [18], whereas 1 hour exposure to pH 3.9 appears to cause no damage to bovine chondrocytes [19]. It is known that long exposure to low pH contributes to abnormalities in cellular function and growth and may cause cell necrosis [18]. Possibly the 30 minutes exposure to the anesthetics performed in this study was insufficient to alter the chondrocyte viability.

Initially, there was an attempt to dilute the anesthetics in culture medium for the maintenance of cellular nutrition. However, mixing of ropivacaine and mepivacaine with the culture medium resulted in crystallization. This observation was previously reported with the local anesthetics and DMEM mixture [6,15,19], and this may be a consequence of the concentration of the medium because free base amino acids and salt complexes have low solubility and may precipitate when added to a more concentrated medium (DMEM, product information). The time of 30 minutes, according to Bogatch et al., was not capable of causing chondrocyte death due to nutrient deprivation.

The 30-minute exposure time to mepivacaine used was according to previous research carried out with equine chondrocytes [6]. There is less information available on the pharmacokinetics of ropivacaine in horses, and, for this reason, the same exposure time described on studies with human chondrocytes was chosen [10]. Pharmacokinetics and clearance rates of IA anesthetics are not fully understood [16] and the time to reach peak concentration may vary according to the species and the anesthetic used [6]. Moreover, several factors may influence these fluctuations; it is presumed that the anesthetics may have a toxic effect on joints in less than an hour [6].

Trypan blue, MTT, and flow cytometry techniques were used in this study to assess cell viability which are based on the evaluation of cell membrane integrity [6], activity of mitochondrial dehydrogenase [6,20], and counting/distinguishing microparticles by their size or labeled fluorescence [6], respectively. Flow cytometry is commonly used on chondrocyte viability evaluations [6,16]. However, cell preparation can cause damage and cell debris can mean loss of damaged cells, so that the result of the evaluation can be overestimated [16]. Breu et al. analyzed viability rates and apoptosis markers with cell-staining methods and observed a reduced proportion of viable cells compared with flow cytometry [16], and this fact may partially explain the differences found regarding the MTT method. Unlike human chondrocytes exposed to bupivacaine, ropivacaine, and mepivacaine [16], in the present study, cell viability rates were considered high using flow cytometry. This observation may be justified by the exposure-time difference between treatments and between the different studies. In this study, the chondrocytes were exposed to treatment for 30 minutes and compared with 1 hour in the referred study aforementioned.

Although it is not possible to draw comparisons between trypan blue exclusion, MTT, and flow cytometry because each one is based on different criteria, different results in the cell viability can be explained by the fact that the trypan blue exclusion assay and flow cytometry are indicators of membrane injury whereas MTT indicates changes in cellular metabolism. One hypothesis is that the assay conditions may have altered the chondrocytes metabolic activity altering the reduction of MTT, and therefore, the reduction of tetrazolium dye without affecting cell viability [20]. In addition, spontaneous reduction of MTT in lipid cell compartments was demonstrated, without the use of enzymatic catalysis; thus, the MTT would be able to detect eventual changes earlier [20]. By contrast, the study of Park et al. reported no difference in outcome

between MTT and flow cytometry to evaluate chondrocyte viability exposed to local anesthetics.

Based on the results obtained by the MTT assay, any substance that modifies the joint environment can cause chondrocyte death. Owing to the chondrocytes limited mitotic potential, cartilage does not regenerate, and therefore, care should be taken in the choice of drug to be administered IA [1]. Remarkably, ropivacaine (ROP7.5 and ROP10) caused less chondrocyte death than mepivacaine (MEP20 and MEP30), which is considered the gold standard of intra-articular anesthetics in horses, worldwide. The present results show that the toxicity of ropivacaine and mepivacaine on equine chondrocytes is similar to human chondrocytes after exposure to 5 mg/mL bupivacaine, 20 mg/mL mepivacaine, and 7.5 mg/mL ropivacaine for 1 hour [16], that is, ropivacaine treatment caused less cell death than bupivacaine and mepivacaine.

In addition, ropivacaine appears to be less toxic to equine monolayer chondrocytes than mepivacaine, when evaluated by flow cytometry. Chondrocyte viability when treated with ROP7.5 did not present differences when compared with cells maintained in culture medium (control group). These findings corroborated other studies, which based on histologic findings of cartilage explant cultures, suggested that mepivacaine can exert a toxic effect on chondrocytes when direct contact is sustained [7]. It has already been demonstrated that mepivacaine is a safer alternative when compared with lidocaine and bupivacaine in horses [6]. However, the present research suggests ropivacaine as even a safer analgesic alternative.

From a clinical perspective, chondrocytes are surrounded by the ECM, which protects them from chemically and mechanically insult, protecting them from drug exposure in a healthy cartilage [6]. Chondrocytes in monolayer culture do not have the protective ECM barrier and the results of this study can be overestimated because chondrocytes were exposed directly to the drugs. In cases of osteoarthritis, when there is cartilage degeneration and chondrocyte exposure, direct contact between local anesthetics and chondrocytes is likely [14]; this situation mimics the environment of this experiment, and ropivacaine appears to be a safer alternative in these cases.

Although in vitro studies provide a controlled environment on a standardized cartilage matrix, many important in vivo influences are lost. Specifically, an in vitro study does not allow clearance of metabolites from the local environment or from systemic metabolism of administered medications [12]. The conditions of a static culture system represent a harsh environment with constant exposure of chondrocytes to all drugs. In the joint of a live horse, drugs would be cleared and buffering mechanisms would be active [7]. Therefore, when drugs are injected IA, potential dilution occurs and both duration of exposure and drug concentration can change accordingly [13].

The authors are aware of the limitations of the present study, which were the use of a single short-term treatment, a single chondrocyte viability assessment after treatment, and the use of monolayer cultures, which directly expose chondrocytes to the treatment. Therefore, our results are not necessarily indicative of what exactly happens in vivo as it is possible that chondrocyte damage is more restricted by the fact they are surrounded by the abundant ECM [1,6,18]. Future experiments could compare chondrocyte viability after longer exposure time and assessment at later time points after exposure and could produce a dose-response curve to the anesthetic agent. Cartilage explants could somehow provide protection to the chondrocytes, better reflecting the response of a healthy cartilage to local anesthetics. Another limitation was the collection of normal appearing cartilage of young horses, as chondrocytes obtained from cartilage of older animals, with osteoarthritis, may be more susceptible to local anesthetics [18]. This emphasizes the need for in vivo studies about the action of ropivacaine in the joint environment so that the extent of the drug's effect can be evaluated in a routine caseload of equine practitioners. However, those using mepivacaine for IA clinical use should be aware of the risk to patients with known cartilage disorders because of the direct exposure to local anesthetics [6].

5. Conclusions

Differences in chondrocyte viability within treatment groups were observed between assays. No difference in chondrocyte viability was observed using the trypan blue assay and only exposure to the lower ropivacaine concentration (ROP7.5) improved chondrocyte viability compared with the higher concentration of ropivacaine (ROP7.5) and mepivacaine (MEP20 and 30) when viability was measured by flow cytometry. However, differences in chondrocyte viability when measured by MTT assay were observed with greater chondrocyte viability measured after exposure to ropivacaine (ROP 7.5 and 10) compared with mepivacaine (MEP20 and MEP30). This study suggests that short-term exposure to ropivacaine may result in less in vitro chondrotoxicity than mepivacaine. Further studies in vivo are warranted to investigate the long-term effects of local anesthetics in equine articular cartilage.

Acknowledgment

The authors would like to thank the equine slaughterhouse Foresta (São Gabriel—Brazil) to provide the limbs for the accomplishment of the experiment. CAPES and Foundation to Support Science and Technology (FATEC), agreement FATEC/UFSM (Grant 5.03.0025), sponsored this study.

References

[1] Rocha Junior SS, Mendes HMF, Beier SL, Paz CFR, Azevedo DSD, Lacerda IGO, Correa MG, Faleiros RR. Avaliações macroscópica e histológica do reparo da cartilagem articular equina tratada com microperfurações do osso subcondral associadas ou não à injeção intra-articular de cartogenina. Pesq Vet Bras 2016;36:272–8.

[2] Santos LCP, Moraes AN, Saito ME. Effects of intra-articular ropivacaine and morphine on lipopolysaccharide-induced synovitis in horses. Vet Anaesth Analg 2009;36:280–6.

[3] Plat P, Richard H, Beauchamp G, Laverty S. In vivo effects of a single intra-articular injection of 2% lidocaine or 0.5% bupivacaine on articular cartilage of normal horses. Vet Surg 2012;41:1002–10.

[4] Harkins JD, Karpiesiuk W, Woods WE, Lehner A, Mundy GD, Rees WA, Dirikolu L, Bass S, Carter WG, Boyles J, Tobin T. Mepivacaine: its pharmacological effects and their relationship t analytical findings in the horse. J Vet Pharmacol Ther 1999;22:107–21.

[5] Harkins JD, Karpiesiuk W, Lehner A, Woods WE, Dirikolu L, Carter WG, Boyles J, Tobin T. Ropivacaine in the horse: its pharmalogical responses, urinary detection and mass spectral confirmation. J Vet Pharmacol Ther 2001;24:89–98.

[6] Park J, Sutradhar BC, Hong G, Choi SH, Kim G. Comparison of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine in equine articular chondrocytes. Vet Anaesth Analg 2011;38:127–33.

[7] Bolt DM, Ishihara A, Weisbrode SE, Bertone AL. Effects of triamcinolone acetonide, sodium hyaluronate, amikacin sulfate, and mepivacaine hydrochloride, alone and in combination, on morphology and matrix composition of lipopolysaccharide-challenged and unchallenged equine articular cartilage explants. Am J Vet Res 2008;69:861–7.

[8] Schumacher J, Schramme MC, Schumacher J, DeGraves FJ. Diagnostic analgesia of the equine digit. Equine Vet Educ 2013;25:408–21.

[9] Silva GB, De La Corte FD, Brass KE, Azevedo MS, Dau S, Ceni F, Lopes LFD. Duration and efficacy of different local anesthetics on the palmar digital nerve block in horses. J Equine Vet Sci 2015;35:749–55.

[10] Piper SL, Kim HT. Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes. J Bone Joint Surg Am 2008;90:986–91.

[11] Baker JF, Mulhall KL. Local anaesthetics and chondrotoxicity: what is the evidence? Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2012;20:2294–301.

[12] Schaefer EC, Stewart AA, Durgam SS, Byron CR, Stewart MC. Effects of sodium hyaluronate and triamcinolone acetonide on glucosaminoglycan metabolism in equine articular chondrocytes treated with interleukin-1. Am J Vet Res 2009;70:1494–501.

[13] Mancini F, Nannarone S, Buratta S, Ferrara G, Stabile AM, Vuerich M, Santinelli I, Pistilli A, Chiaradia E. Effects of xylazine and dexmedetomidine on equine articular chondrocytes in vitro. Vet Anaesth Analg 2017;44:295–308.
[14] Chu CR, Izzo NJ, Papas NE, Fu FH. In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. Arthroscopy 2006;22:693–9.
[15] Lo IKY, Sciore P, Chung M, Liang S, Boorman RB, Thornton GM, Rattner JB, Muldrew K. Local anesthetics induce chondrocyte death in bovine articular cartilage disks in a dose- and duration-dependent manner. Arthroscopy 2009;25:707–15.
[16] Breu A, Rosenmeier K, Kujat R, Angele P, Zink W. The cytotoxicity of bupivacaine, ropivacaine, and mepivacaine on human chondrocytes and cartilage. Anesth Analg 2013;117:514–22.
[17] Farkas B, Kvell K, Czömpöly T, Illés T, Bárdos T. Increased chondrocyte death after steroid and local anesthetic combination. Clin Orthop Relat Res 2010;468:3112–20.
[18] Dragoo JL, Korotkova T, Kim HJ, Jagadish A. Chondrotoxicity of low pH, epinephrine, and preservatives found in local anesthetics containing epinephrine. Am J Sports Med 2010;38:1154–9.
[19] Bogatch MT, Ferachi DG, Kyle B, Popinchalk S, Howell MH, Ge D, You Z, Savoie FH. Is chemical incompatibility responsible for chondrocyte death induced by local anesthetics? Am J Sports Med 2010;38:520–6.
[20] Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochem 2012;114:785–96.

4. ARTIGO 2

Trabalho submetido para publicação:

Inflammatory and tissue remodeling expression profile of equine chondrocytes exposed to mepivacaine and ropivacaine

Gabriele Biavaschi Silva, Antônio Alcemar Beck Júnior, Heloisa Einloft Palma, Miguel Gallio, Camila Cantarelli, Julien Wergutz, Kalyne Bertolin, Alexandre Krause, Luciana Maria Fontanari Krause, Alfredo Quites Antoniazzi, Karin E Brass, Flávio D De La Côrte

OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE, 2019

ABSTRACT

Objective: Evaluation of inflammatory and tissue remodeling expression profile of equine chondrocytes exposed to 20mg/ml mepivacaine and 10mg/ml ropivacaine.

Design: Cultures of equine chondrocytes in pellets were exposed for 30 minutes to 0.9% saline solution (SAL), Mepivacaine 20mg / ml (MEP20) or Ropivacaine 10mg / ml (ROP10). Subsequently the cultures were evaluated for *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Acan* and *Col2a1* gene expression. The pre and post treatment expression and the differences in expression between the groups were compared.

Results: No differences in the expression of *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Acan* and *Col2a1* were observed between pre and post treatment in any of the evaluated biomarkers on SAL. Differences in the expression of collagen type II ($p=0.0142$), *Il6* ($p=0.0121$) and *Mmp13* ($p=0.0487$) were observed before and post treatment with MEP20 ($p<0.05$). ROP10 treatment resulted in differences in expression of *Il6* ($p= 0.0022$), *Mmp9* ($p=0.0082$) and *Mmp13* ($p=0.0327$). In the evaluation between groups, the expression of the variables evaluated was similar between MEP20, ROP10 and SAL.

Conclusions: The anabolic and catabolic biomarkers of cartilage are similar among equine chondrocytes treated *in vitro* with mepivacaine, ropivacaine and saline solution.

Keywords: Anaesthesia, local anaesthetics, intra-articular, gene expression, inflammatory mediators.

INTRODUCTION

Local anesthetics are widely used intra-articularly (IA) to provide analgesia at orthopedic procedures in humans[1-3] and horses[4]. Additionally, in horses, local anesthetics are

widely used for identifying pain sites during lameness examination. However, these drugs should be used carefully due to their potential chondrotoxicity. Recently, the efforts to develop an effective and safe analgesic treatment for joint pain resulted in an increased focus upon the role of intrasynovial analgesia[5].

Chondrocyte viability when exposed to different local anesthetics has already been evaluated in different species[1,2,4,6,7]. Despite mepivacaine being the drug of choice for IA use in horses worldwide[4,8,9], ropivacaine is the local anesthetic that produces less chondrolysis in humans[3] and horses[7] .

Considering that chondrocyte loss has been implicated in the development of osteoarthritis (OA), it is crucial to determine the extent of damage caused by local anesthetics on chondrocytes. It is important to consider that the basic mechanisms of chondrotoxicity are not well understood[3]. Destruction and inflammation of articular cartilage also are factors that interact in the development of OA[10].

Currently, biochemical markers are a great promise for detection of changes in the early stages of joint degeneration and, therefore, may provide useful information in assessing of cartilage integrity before irreversible alterations might occur in the joint[11,12]. Furthermore, it has been suggested that the use of biomarkers will help to better understand the effects of a variety of joint pain therapies[13]. Challenges imposed on the joints correspond to the perfect balance between anabolic and catabolic processes, responsible for joint homeostasis[10,14]. In this regard, the measurement of anabolic and catabolic factors seems to be very useful in evaluating the toxicity of a local anesthetic.

In this study, in order to evaluate the anabolic and catabolic effects of mepivacaine and ropivacaine on articular cartilage, cultured equine chondrocytes were exposed to mepivacaine 20mg/ml and ropivacaine 10mg/ml, for further *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Acan* and *Col2a1* gene expression evaluation. The information obtained might aid the practitioner's

selection of local anesthetics for IA use, and might also show possible side effects of the use of mepivacaine and ropivacaine on equine chondrocytes.

Due to the lower potential chondrotoxicity of ropivacaine[3,7] the authors believe that this anesthetic has a lower capacity to modify catabolic and anabolic cartilage factors than mepivacaine.

MATERIAL & METHODS

Three-dimensional culture of equine chondrocytes

Equine forelimbs used in this study were obtained from a slaughterhouse (Foresta Inc.). To avoid individual variations, three healthy metacarpophalangeal joints from three different horses were used. Prior to treatment, chondrocytes were obtained by enzymatic digestion as described by Silva et al. (2019)[9] and then frozen at -80ºC. Chondrocytes were thawed at room temperature, eluted in PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco, NY, EUA) and counted using a Neubauer chamber; viability was evaluated by the Trypan blue assay. Equine tissues were used in accordance with the guidelines of the Ethics for Animal Use Research Committee of the Federal University of Santa Maria (protocol number CEUA 7193301116). After thawing, chondrocytes were suspended in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, NY, EUA) supplemented with 5% FBS ("Fetal Bovine Serum", Invitrogen, CA, EUA) and 1% penicillin/streptomycin/glutamine (Invitrogen, CA, EUA). The medium containing chondrocytes was transfered to conic 15ml polypropylene cell culture tube (4 ml/tube) which were centrifuged at 200g for five minutes to form chondrocyte pellets containing 1.5 x 10^5 cells each. Pellets were incubated at 37ºC for seven days to allow formation of an extracellular matrix. The culture medium was changed every three days,

whenever medium acidification occurred. Treatments were administered on day 7 and pellets were incubated for additional 30 minutes.

Experimental groups

Equine chondrocyte pellets were divided in three treatment groups: 0.9% saline solution (saline control) (HalexiIstar, GO, Brazil) (SAL); Mepivacaine 20mg/ml (Nova DFL Indústria e Comércio S.A., RJ, Brazil) (MEP20) and Ropivacaine 10mg/ml (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, SP, Brazil) (ROP10).

Prior to each treatment, the culture medium was removed. Then, the treatments were added and the cells incubated for additional 30 minutes. After treatment, pellets were centrifuged at 200g rpm for five minutes, medium was removed and FBS was added. Subsequently, FBS was removed and cells frozen at -80ºC in TRIzol® (Invitrogen, CA, EUA) for further analysis.

RNA extraction, reverse transcription and real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR):

All primers and probes used in this study were derived from the *Equus caballus* genome (GenBank). RNA was extracted from chondrocyte pellets using TRIzol® according to the manufacturer's instructions. RNA quantification was performed using Nano-Drop spectrophotometer and RNA purification evaluated with 260/280nm mean absorbance (Thermo Scientific). RNA was treated with amplification degree of 0.1U DNase (Invitrogen) for 15 min at 27°C, followed by inactivation of DNase with 1 µl of EDTA at 65°C for 10 min. Double-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized from 300 ng of total RNA

with random hexamer primers using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) according to the manufacturer's recommendations. Quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were performed on a CFX384 (BioRad) thermocycler using BRYT Green® dye and from GoTaq® qPCR Master Mix Taq polymerase DNA (Promega Corporation) with 12.5 ng of cDNA in 2 µl. A common program of thermal cycling (initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing / extension at 60°C for 30 seconds) was used to amplify each transcript. Melting curve analyses were performed to verify the product's identity. Primers were validated by standard curves and the sequences are described on Table 1. Reactions with a coefficient of determination (R^2) greater than 0.98 and efficiency between 85 and 110% were considered optimal. The samples were processed in duplicate and results expressed relative to the levels of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*G3pdh*) and ribosomal protein L4 (*Rpl4*). Data were normalized using sample calibrator using ΔΔCq method as described by Pfaffl (2001)[15]. The relative abundance of each gene was analyzed by ANOVA.

Statistical analysis

For comparison between treatments, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used. Comparative gene expression was performed before and after treatment using Student's t-test (GraphPad Prism 6, San Diego, California, USA) with significance set at 5%.

RESULTS

After thawing of the pellets kept in trizol, it was possible to obtain similar quality of RNA in the different groups. No differences in the expression were observed between pre and post treatment in any of *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Acan* and *Col2a1* on SAL (Fig. 1). In turn, chondrocyte cultures treated with MEP20, showed differences in the expression of *Col2a1* (p=0.0142), *Il6* (p=0.0121) and *Mmp13* (p=0.0487) before and after treatment (Fig.2). ROP10 treatment resulted in differences in expression of *Il6* (p= 0.0022), *Mmp9* (p=0.0082) and *Mmp13* (p=0.0327) before and after treatment (Fig.3).

Between groups, treatment with MEP20, ROP10 and SAL did not cause any changes on the expression of *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Acan* and *Col2a1* (Fig.4).

DISCUSSION

In this study only mepivacaine was able to alter the expression of collagen type II after treatment. This could suggest that ropivacaine is a safer drug for use on chondrocytes, although no difference was observed comparing treatments. Short-time exposure of equine chondrocytes to mepivacaine and ropivacaine has shown that these drugs have saline-like effects on cartilage metabolism. Saline solution is frequently used to obtain joint distension during arthroscopies[16,17] and sodium chloride is one of the diluents of mepivacaine and ropivacaine in commercial presentations, allowing comparison between treatments.

In view of the scientific, economic and ethical benefits, chondrocyte cultures in pellets are easily obtained and stored. In this study, pellet cultures were maintained for seven days and presented as a semi-solid cell cluster observed at the bottom of the tube. Moreover, gentle manipulation of the tube was able to separate the cell aggregate. According to Otero et al. (2005)[18], with an average culture period of seven days, moderate amounts of total RNA can be extracted.

The exposure time of mepivacaine[4] and ropivacaine[2] was chosen based on studies using horse and human chondrocytes, respectively. Furthermore, maximum concentration may be influenced by many factors, such as species and anesthetic used[4]. Barry et al. (2015)[19] observed that, in healthy canine joints, drug levels in synovial fluid corresponded to only 11% of the initial concentration, 30 minutes after bupivacaine administration. Therefore, the exposure time to a local anesthetic might be even shorter in the *in vivo* situation than that used in this study.

Initially, for maintenance of cellular nutrition, dilution of the anesthetics in culture medium was attempted. However, mixing ropivacaine and mepivacaine solutions with the culture medium resulted in medium crystallization. This observation was already reported when local anesthetics and DMEM were associated[4,20,21]. Thus, this may be a consequence of the medium concentration, since free base amino acids and salt complexes having low solubility may precipitate when added to a more concentrated medium (DMEM, product information). *In vitro* use of saline solution can inhibit cartilage metabolism[22], however, in this study, the 30 minute exposure to saline was not able to alter the expression of cartilage catabolic and anabolic factors. This is a relevant information for saline selection as a control, since the balance of anabolic and catabolic activities is crucial for maintenance of cartilage integrity[10,23].

The short-time exposure to SAL, MEP20 and ROP10 was not able to alter the expression of *Ilb1* and *Acan*. IL-1 is considered the major cytokine in the development of OA, responsible for upregulation of IL-6 and MMPs expression[12,23,24] and acting indirectly on aggrecan degradation[12,24]. In this study, we believe that the maintenance in *Ilb1* expression was responsible for the consequent maintenance of aggrecan. These results differ from studies *in vivo*, which used other IA local anaesthetics (bupivacaine and lidocaine)[25], and *in vitro* trials with equine chondrocytes exposed to a sodium hyaluronate and triancinolone[24]. One

hypothesis is that drug concentrations and exposure time have not been sufficient to promote alteration in chondrocyte homeostasis.

In this study, treatment with MEP20 caused an increase in type II collagen levels and, interestingly, a dowregulation of *Il6* and *Mmp13* expression. Increased collagen levels suggest the anabolic effect of mepivacaine on chondrocytes, which was also reported in horses after IA with lidocaine and bupivacaine[25]. Differently, exposure of equine chondrocytes to sodium hyaluronate and triancinolone acetate caused a decrease in type II collagen levels, suggesting degradation of extracellular matrix[24]. Apparently, the low levels of *Mmp1*3 do not justify the increase in the levels of collagen type II, since collagen degradation is strongly influenced by an increase of *Mmp13*[12].

Different than expected, cells exposed to ROP10 showed dowregulation of *Il6*, *Mmp9* and *Mmp13* expression. In horses, *Mmp9* has been identified, characterized and its articular and inflammatory cellular sources demonstrated[26]. The measurement of expression of this enzyme can provide important information on chondrocyte degradation. Although MMP-9 is increased in the synovial fluid of human[27] and equine[26] OA joints, cultures of human chondrocytes are not regulated by *MMP9* or the inflammatory stimuli of *IL1β* treatment[28]. One hypothesis is that the increase of chondrocyte *Mmp9* can be triggered by the appearance of matrix degradation fragments. Alternatively, genomic demethylation within the promoter region of gelatinase B might lead to increased expression of this gene in OA chondrocytes[28].

Some hypotheses can be raised for the downregulation of *Mmp13* and *Il6* caused by the MEP20 and ROP10 treatments. The first one considers that chondrocyte death has occurred, as reported by Jacobs et al. (2011)[29] after exposure to lidocaine. However, a recent study demonstrated high viability rates after 30 minutes of exposure to mepivacaine and ropivacaine[7]. In contrast, downregulation of *IL6* has already been observed in cell cultures in the absence of chondrogenic medium, which seems a plausible explanation[30]. Expression of

IL6 in chondrocytes was demonstrated, and this cytokine is considered a regulator of inflammatory and immunological processes[30]. Moreover, high *IL6* levels have been shown to be present in synovial fluid of OA joints[31]. Probably, in the present study, the expression of *Il6* by chondrocytes was influenced by the absence of chondrogenic medium, not reflecting the expression of this biomarker after exposure to mepivacaine and ropivacaine. Although low levels of *Mmp13* have not been previously reported, we infer that also undergoes effects in the absence of chondrogenic medium.

Limitations of this study include the fact that the results are based on an *in vitro* chondrocyte culture model, and it is difficult to reproduce the dynamic concentrations of the compounds *in vitro*, therefore, they may not reflect the *in vivo* situation. The evaluation of chondrocyte exposure to mepivacaine and ropivacaine *in vivo* should be investigated to provide conclusive data regarding its potential chondrotoxicity. Another limitation was the impossibility of *Il6* expression analysis, as the method of treatment and absence of culture medium were not effective for measuring this interleukin.

It was observed that the use of mepivacaine and ropivacaine produced changes in chondrocyte homeostasis, although only mepivacaine was able to alter the levels of collagen type II. The increase in catabolism of type II collagen suggests that ropivacaine is a safer alternative. However, no differences were observed when comparing treatments with the saline control group. Therefore, our results are not necessarily indicative of what exactly occurs with an *in vivo* cartilage. Much work remains to be done, including *in vivo* studies to evaluate the action of these drugs in the joint environment.

CONCLUSION

The anabolic and catabolic biomarkers of cartilage are similar among equine chondrocytes treated *in vitro* with mepivacaine, ropivacaine and saline solution.

Acknowledgements

The authors thank the equine slaughterhouse Foresta (São Gabriel - Brazil) to provide the limbs for the accomplishment of the experiment.

Contributions

All authors should have made substantial contributions to all three of sections (1), (2) and (3) below:

(1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data

(2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content

(3) final approval of the version to be submitted

Role of the funding source

This study was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES) and Foundation to Support Science and Technology (FATEC - Grant 5.03.0025).

Competing interest statement

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Chu CR, Izzo NJ, Papas NE, Fu FH. In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. Arthroscopy 2006; 22:693-699.
2. Piper SL, Kim HT. Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes. J Bone Joint Surg 2008; 90: 986-991.
3. Breu A, Rosenmeier K, Kujat R, Angele P, Zink W. The cytotoxicity of bupivacaine, ropivacaine, and mepivacaine on human chondrocytes and cartilage. Anesth Analg 2013; 117:514-522.
4. Park J, Sutradhar BC, Hong G, Choi SH, Kim G. Comparison of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine in equine articular chondrocytes. Vet Anaesth Analg 2011; 38:127–133.
5. Mancini F, Nannarone S, Buratta S, Ferrara G, Stabile AM, Vuerich M, et al. Effects of xylazine and dexmedetomidine on equine articular chondrocytes in vitro. Vet Anaesth Analg 2017; 44:295-308.
6. Chu CR, Izzo NJ, Papas NE, Fu FH. In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. Arthroscopy 2006; 22 (7): 693-699.
7. Silva GB, DeLaCorte FD, Brass KE, Palma HE, Gallio M, Cantarelli C *et al*. Viability of Equine Chondrocytes After Exposure to Mepivacaine and Ropivacaine In Vitro. J Equine Vet Sci 2019; 77: 80-85
8. Bolt DM, Ishihara A, Weisbrode SE, Bertone AL. Effects of triamcinolone acetonide, sodium hyaluronate, amikacin sulfate, and mepivacaine hydrochloride, alone and in combination, on morphology and matrix composition of lipopolysaccharide-challenged and unchallenged equine articular cartilage explants. Am J Vet Res 2008; 69:861-867.

9. Silva GB, De La Côrte FD, Brass KE, Azevedo MS, Dau S, Ceni F, *et al*. Duration and efficacy of different local anesthetics on the palmar digital nerve block in horses. J Equine Vet Sci 2015; 35:749-755.
10. Yao W, Han Q, Wang L, Niu Z. Ropivacaine relieves pain and prevents chondrocyte degradation probably through Calcineurin/NFAT1 signaling pathway in osteoarthritis rats. Eur J Pharmacol 2018; 818: 518–524.
11. Brama PAJ, Tekoppele JM, Beekman B, Van Weeren PR, Barneveld A. Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis, and osteochondrosis. Ann Rheum Dis 1998; 57:697-699.
12. Frisbie DD, McIlwraith CW, Grauw JC. Synovial Fluid and Serum Biomarkers. In: Joint Disease in the Horse, McIlwraith CW, Frisbie D, Kawcak C, Van Weeren R. Ed. Philadelphia: Saunders 2016:179–191.
13. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Therap 2001; 69:89-95.
14. Van Weeren PR. General anatomy and physiology of joint. In: Joint Disease in the Horse, McIlwraith CW, Frisbie D, Kawcak C, Van Weeren R. Ed. Philadelphia: Saunders 2016:1-24.
15. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29: 2000-2007.
16. Shinjo H, Nakata K, Shino K, Hamada M, Nakamura N, Mae T, *et al*. Effect of irrigation solutions for arthroscopic surgery on intraarticular tissue: comparison in human meniscus-derived primary cell culture between lactate Ringer's solution and saline solution. J Orthopaed Res 2002; 20:1305-1310.

17. McIlwraith CW, Nixon AJ, Wright IM, Boening KJ. General technique and diagnostic arthroscopy. In: Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse, Second edition. McIlwraith CW, Nixon AJ, Wright IM, Boening KJ. Ed. Philadelphia: Mosby 2005:31-47.
18. Otero M, Favero M, Dragomir C, El Hachem K, Hashimoto K, Plumb DA, *et al*. Human Chondrocyte Cultures as Models of Cartilage-Specific Gene Regulation. Methods Mol Med 2005; 107:69–95.
19. Barry SL, Martinez SA, Davies NM, Remsberg CM, Sayre L, Bachele ZA. Synovial fluid bupivacaine concentrations following single intra articular injection in normal and osteoarthritic canine stifles. J Vet Pharmacol Therap 2015; 38:97-100.
20. Lo IKY, Sciore P, Chung M, Liang S, Boorman RB, Thornton GM, *et al*. Local Anesthetics Induce Chondrocyte Death in Bovine Articular Cartilage Disks in a Dose- and Duration-Dependent Manner. Arthroscopy 2009; 25: 707–715.
21. Bogatch MT, Ferachi DG, Kyle B, Popinchalk S, Howell MH, Ge D, *et al.* Is Chemical Incompatibility Responsible for Chondrocyte Death Induced by Local Anesthetics? Am J Sport Med 2010; 38: 520–526.
22. Gulihar A, Bryson DJ, Taylor GJS. Effect of Different Irrigation Fluids on Human Articular Cartilage: An In Vitro Study. Arthroscopy 2013 29(2):251–256.
23. McIlwraith CW. Traumatic Arthritis and Posttraumatic Osteoarthritis in the Horse. In: Joint Disease in the Horse, McIlwraith CW, Frisbie D, Kawcak C, Van Weeren R. Ed. Philadelphia: Saunders 2016:33–48.
24. Schaefer EC, Stewart AA, Durgam SS, Byron CR, Stewart MC. Effects of sodium hyaluronate and triamcinolone acetonide on glucosaminoglycan metabolism in equine articular chondrocytes treated with interleukin-1. Am J Vet Res 2009; 70:1494-1501.

25. Piat P, Richard H, Beauchamp G, Laverty S. *In Vivo* effects of a single intra-articular injection of 2% lidocaine or 0.5% bupivacaine on articular cartilage of normal horses. Vet Surg 2012; 41:1002–1010.
26. Clegg PD, Coughlan AR, Riggs CM, Carter SD. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. Equine Vet J 1997; 29:343-348.
27. Tchetverikov I, Ronday HK, Van El B, Kiers GH, Verzijl N, TeKoppele JM, *et al.* MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2004; 63:881–883.
28. Söder S, Roach HI, Oehler S, Bau B, Haag J, Aigner T. MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage. Clin Exp Rheumatol 2006; 24:302-304.
29. Jacobs TF, Vansintjan PS, Roels N, Herregods SS, Verbruggen G, Herregods LL *et al*. The effect of Lidocaine on the viability of cultivated mature human cartilage cells: an *in vitro* study. Knee Surg Sport Tr A 2011; 19:1206–1213.
30. Guerne PA, Carson DA, Lotz M. Il-6 production by human articular chondrocytes modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. J Immunol 1990; 144:499-505.
31. Tsuchida AI, Beekhuizen M, Bot AGJ, Geurts B, Bekkers JEJ, Dhert WJA, *et al*. The Role of IL-6 in Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. In: Orthopaedic Research Society 2012 Annual Meeting, San Francisco, Californ.

Table 1 - Primer sequences used for RT-qPCR.

Gene	Acess Nr.	Sequence of primer
Acan	XM_014733894.1	F – AGACAGCCGTCACAGACCAG
		R – ACGATGCTGCTCAGGTGTGA
Col2a1	NM_001081764.1	F – TGGTGACCCTGGCCTTCAAG
		R – AACGATGCCCCTCTGTCCAG
Ilb1	NM_001082526.1	F – TATGTGTGTGATGCAGCTGTGC
		R – ATGCAGAACACCACTTGTTGG
Il6	NM_001082496.2	F– TCCCTCTTCACAAGCACCGTC
		R – GTCTGCAGTGGTGAGTAGTGGT
Mmp9	NM_001111302.1	F – TCTTCAAGGACGGGAGGTACT
		R – TCCTCAAAGGCGGAATCCAG
Mmp13	NM_001081804.1	F – GAGCACTCATGTTTCCGATCTA
		R – ATGTTTAGGGTTCGGGTCTTC
G3pdh	NM_001163856.1	F - GGT GGA GCC AAA AGG GTC AT
		R - TTC ACG CCC ATC ACA AAC AT
Rpl4	XM_001497094.3	F – TTCATCGCAGGGTCCTGAAG
		R – TCCACCCGGAGTTTGTGATTC

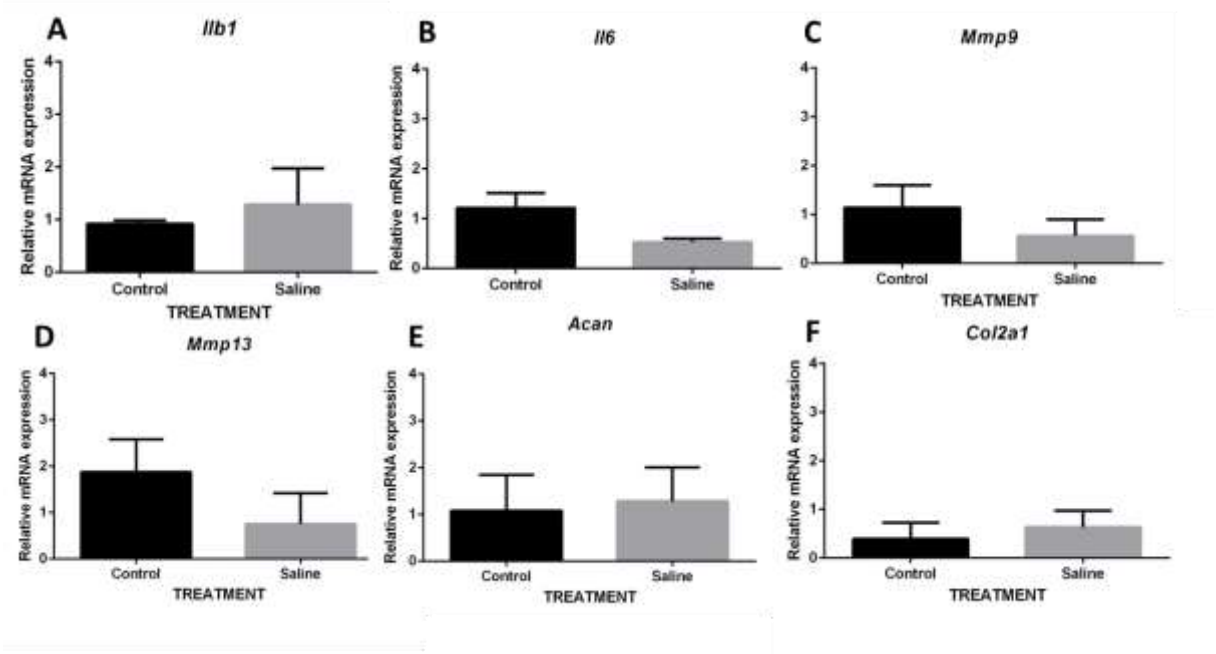

Fig.1: Relative mRNA expression in cultures of chondrocytes pre and post treatment with saline (SAL): A) *Ilb1* (p>0.05); B) *Il6* (p>0.05) C) *Mmp9* (p>0.05); D) *Mmp13* (p>0.05) E) *Acan* (p>0.05) and F) *Col2a1* (p>0.05).

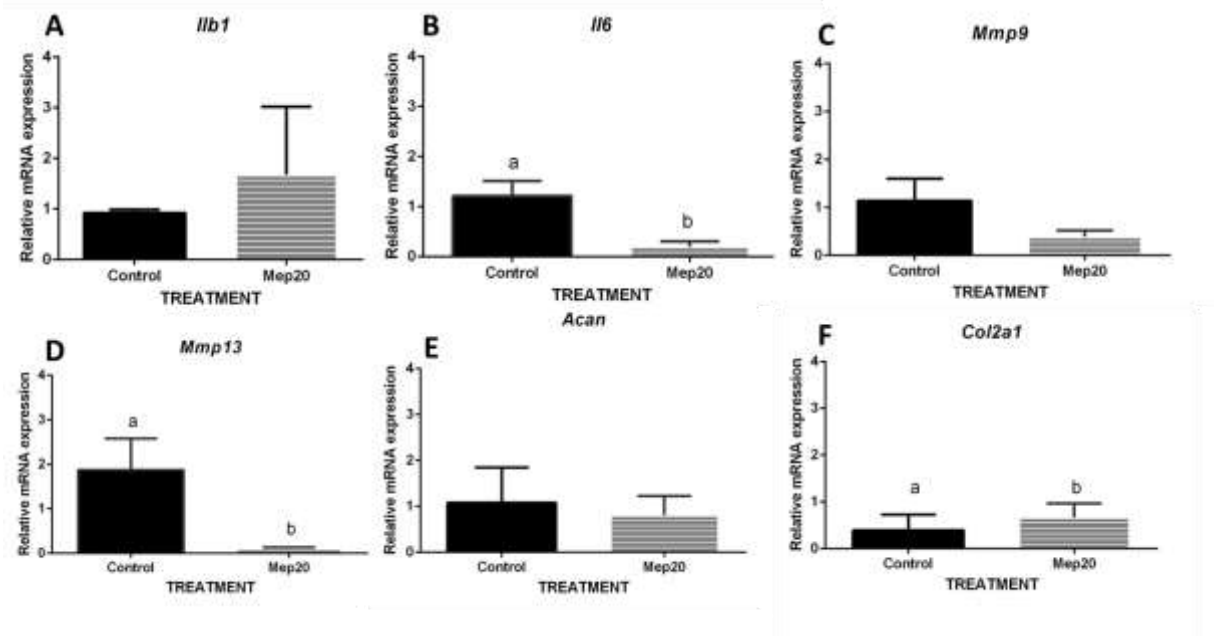

Fig.2: Relative mRNA expression in cultures of chondrocytes pre and post treatment with mepivacaine 20mg/ml (MEP20): A) *Ilb1* (p>0.05); B) *Il6* (p<0.05), different letters show difference; C) *Mmp9* (p>0.05); D) *Mmp13* (p>0.05), different letters show difference; E) *Acan* (p>0.05) and F) *Col2a1* (p<0.05), different letters show difference.

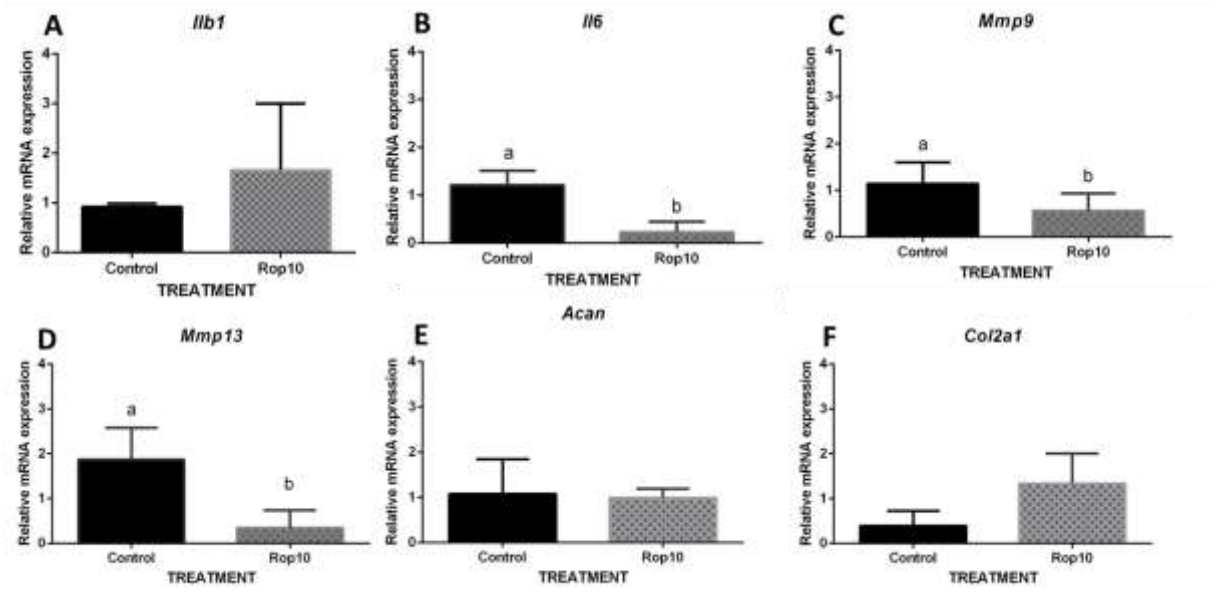

Fig.3: Relative mRNA expression in cultures of chondrocytes pre and post treatment with ropivacaine 10mg/ml (ROP10): A) *Ilb1* ($p>0.05$); B) *Il6* ($p<0.05$), different letters show difference; C) *Mmp9* ($p<0.05$), different letters show difference; D) *Mmp13* ($p<0.05$), different letters show difference; E) *Acan* ($p>0.05$) and F) *Col2a1* ($p<0.05$).

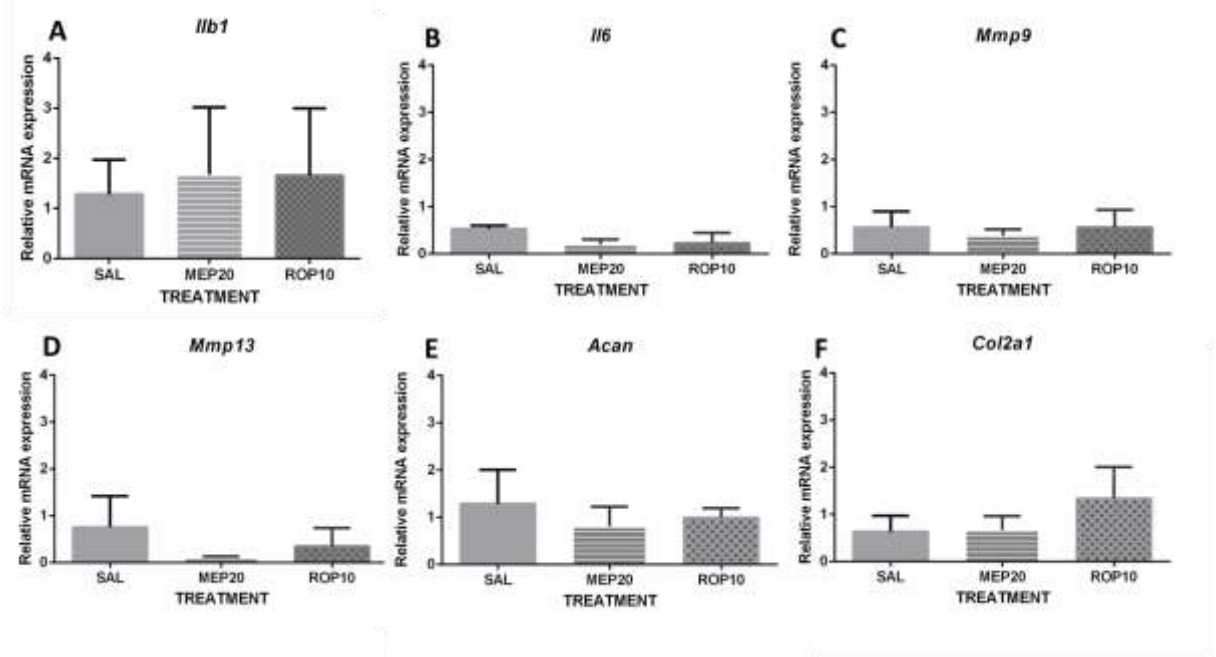

Fig.4: Relative mRNA expression in cultures of chondrocytes treated with saline (SAL), mepivacaine 20 mg / ml (MEP20) and ropivacaine 10 mg / ml (ROP10): A) *Ilb1* ($p>0.05$); B) *Il6* ($p>0.05$) C) *Mmp9* ($p>0.05$); D) *Mmp13* ($p>0.05$) E) *Acan* ($p>0.05$) and F) *Col2a1* ($p>0.05$).

5. ARTIGO 3

Trabalho a ser submetido para publicação:

Effects of intra-articular ropivacaine administration in horses

Gabriele Biavaschi Silva, Flavio De La Côrte, Karin Erica Brass

EQUINE VETERINARY JOURNAL, 2019

ABSTRACT

Background: Local anesthetics are routinely used in the diagnosis and treatment of musculoskeletal injuries in horses, however, are potentially toxic to chondrocytes and should be used with caution. Since chondrocyte loss is one of the events implicated in the development of arthritis, it is important to determine the toxicity of the intra-articular injection of ropivacaine, an alternative to mepivacaine for some clinicians.

Objectives: The aim of this study was to compare the effects of intra-articular administration of 10 mg/ml ropivacaine and saline.

Study design: Randomized study.

Methods: In this study, eight adult ponies were used, in which one tibiotarsal joint was treated with saline and the contralateral one with 10 mg/ml ropivacaine. Prior to the treatment, synovial fluid collection was performed. After 24 hours of treatment the animals were anesthetized, new synovial fluid aliquots and samples of cartilage and synovia were collected from tibiotarsal joints. The synovial fluid samples were evaluated for TNCC, total protein and evaluation of the mucin precipitate. Through qPCR, in the synovia samples, *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9* and *Mmp13* were evaluated; these same factors were evaluated in the cartilage added with Acan and Col2a1.

Results: In synovial fluid TNCC values were higher 24 hours after administration of saline and ropivacaine ($p<0.05$). However, no difference was observed between ropivacaine and saline treatments after 24 hours ($p>0.05$). Protein values did not vary at pre and 24 h after infiltration with both saline and ropivacaine ($p>0.05$). There was also no difference between protein values between joints treated with saline and ropivacaine ($p>0.05$). The quality of the mucin precipitate was lower 24 hours after treatment with ropivacaine ($p<0.05$). However, there was no difference between the pre and post 24 hour saline and IA saline and ropivacaine

treatments. In the synovia samples the levels of *Ilb1*, *Il6* and *Mmp13* gene expression showed no difference between IA treatments with saline and ropivacaine ($p>0.05$). Nevertheless, *Mmp9* levels were shown to be increased in the joints treated with ropivacaine ($p<0.05$). In evaluations of cartilage samples after treatment with saline and ropivacaine, no differences were observed in expression levels of *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Acan* and *Col2a1* ($p>0.05$).

Main limitations: The major limitation of this study was the absence of a previously determined ropivacaine dosage for intra-articular use in horses. Additionally, in the changes found in synovial fluid it is not possible to predict whether TNCC after serial arthrocentesis reflects the joint cellularity or the result of blood contamination of the sample. Another limitation refers to the results of the biomarkers, since a collection of pre-treatment biopsies was not performed, it was not possible to make a comparison between time points.

Conclusions: The administration of saline and ropivacaine in the tibiotarsal joint causes inflammatory change of the synovial fluid. However, differences between anabolic and catabolic cartilage biomarkers are not observed between treatments. Only *Mmp9* levels in the synovia were increased after ropivacaine treatment, suggesting close contact.

INTRODUCTION

The high prevalence of lameness in horses and respective economic losses to the owners due to early retirement or days off competition are known [1]. Among the causes of lameness, joint diseases account for approximately 15% of cases [2] and, in the majority of cases, cartilage failure has been identified as an important contributory factor [3]. The lameness evaluation in horses is made primarily through a clinical examination, which includes the use of intra-articular (IA) local anesthetic agents that allow to accurately

identifying the pain source [4]. In addition, the administration of local anesthetics IA is also used for postoperative pain relief [5].

Local anesthetics act by blocking the conduction of sensory neurons, retarding the influx of Na^+ ions into the cells [6,7]. Among local anesthetics, mepivacaine is the most frequently used local anaesthetic agent for IA injection in equine practice worldwide [6,8-11]. Alternatively to mepivacaine, ropivacaine presents itself as a promising drug for intra-articular pain relief and is considered to have fewer systemic side-effects [12].

Several studies have demonstrated the *in vitro* effects of local anesthetics on human [12-15], bovine [16] and equine [8,9,17] chondrocytes and cartilage. In equine chondrocyte cultures, Park et al. (2011) [9] demonstrated that mepivacaine produced less cell death than lidocaine and bupivacaine, two commonly used local anesthetics; whereas, in human chondrocytes, ropivacaine produced even less chondrotoxicity than mepivacaine [15]. Although *in vitro* studies provide a controlled environment on a standardized cartilage matrix, many important *in vivo* stimuli are lost. Thus, *in vivo* studies in equine joints have demonstrated inflammatory effects of bupivacaine and lidocaine [5], while the anti-inflammatory effects of ropivacaine IA are suggested in horses [4] and mices [18]. In humans, Piper & Kim (2008) [12] suggest ropivacaine as a safe intra-articular anesthetic; however, studies should be performed to evaluate this anesthetic in horses.

Considering previous studies, ropivacaine has been shown as a less toxic alternative in humans, which motivated the interest in IA use in equine patients. The present study evaluated the effects of the administration of a single application of ropivacaine 10 mg / ml in the tibiotarsal joint of ponies. It is expected that the adopted model will provide data about toxicity and low inflammatory potential, making it possible to include ropivacaine as a

validated anesthetic agent for several procedures that are performed in the equine medicine routine.

MATERIAL AND METHODS

Animals: Eight male ponies, ages between 11 and 17 years (15,6 ± 2,6), body weight between 136 and 215 kg (179 ± 27,2), were selected. Before beginning of the study, according Baxter (2011) [19], radiographic, ultrasonographic and thermographic images studies were obtained to assess the tibiotarsal joints of both pelvic limbs. The animals were confined in a stall on the day of the experiment and kept in stalls for a period of 10 days after arthroscopy. The ponies had alfalfa hay and water *ad libitum*.

Treatments: After randomization, 5ml of 10 mg/ml ropivacaine[a] was administered in one tibiotarsal joint, with the contralateral tibiotarsal joint remaining as control, receiving 5 ml of 0.9% NaCl[b] saline solution.

Sample collections: Immediately before treatment, synovial fluid was collected from the tibiotarsal joints (pre-treatment sample). Due to the small size of the experimental models the arthrocentesis of the tibiotarsal joint was performed with the animals under general anesthesia in dorsal recumbency using 5 ml syringes, 21 G needles and sterile gloves after previous aseptic skin preparation with povidone iodine and alcohol as suggested by Baxter (2011) [19]. The injectable anesthesia protocol included xylazine[c] (0.5 mg/kg/IV) and acepromazin[d] (0.05 mg/kg/IV), followed by anesthetic induction with ketamine[e] (3 mg/kg/IV) and diazepam[f] (0.01 mg/kg/IV). Samples of synovial fluid, packed in EDTA tubes, were sent for immediate evaluation of cellularity (total cell count and cell differentiation) and total protein concentration.

After 24 hours of treatment and placebo administration, new synovial fluid samples were collected (as before) in addition to synovial and articular cartilage biopsy. For the biopsy collection procedure, animals were submitted to general anesthesia for arthroscopic surgery, as pre-anesthetic medication was used with xylazine (0.5 mg/kg/IV) and acepromazine (0.05 mg/kg/IV), anesthetic induction was performed with ketamine (3 mg/mg/IV) and diazepam (0.1 mg/kg/IV) and maintained with isoflurane[g]. In the operating room, the horses were placed in dorsal recumbency with the pelvic limbs extended. Following the principles of McIlwraith et. al (2014) [20], the tibiotarsal joints were clipped and aseptically prepared for arthroscopy. Samples of synovial fluid were aspirated from the treated and control joint using a 21G needle, and processed as described in the first collection. Once into the joints, synovial membrane and cartilage samples were collected using a 4 mm Ferris-Smith rongeur, after collection of each sample the used rongeurs were discarded to avoid contamination with RNA of another sample. The synovia and cartilage biopsies were conditioned in RNA-free eppendorfs and frozen at -80°C for further evaluation. The gene expression of biomarkers *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Acan* and *Col2a1* were measured by qPCR. All the samples were analyzed in the same run to avoid disparities of the technique.

After the surgical procedure to collect the samples, the arthroscopic portals sites were sutured with 2-0 mononylon in a cruciate pattern and the limb protected with elastic bandage. After surgery, in the first day, the ponies received phenylbutazone[g] 4.4 mg/kg/IV and 20 mg/kg cephalothin[i] sodium intravenously as a prophylactic antibiotic therapy.

Complementary diagnostic tests: As described by Baxter (2011) [19], radiographic evaluation of the tibiotarsal joints in the lateral-medial, dorso-palmar, dorsolateral-palmaromedial, oblique and dorsomedial-palmarolateral oblique views were performed before treatments.

The synovial fluid analysis included total nucleated cell count (TNCC), protein content and evaluating the quality of mucin precipitate. The determination of the quality of the mucin precipitate was performed according to Van Pelt (1974) [21] and McIlwraith & Trotter (1996) [3]. According to the coagulation of the precipitate the mucin quality was classified as very good (1), reasonable (2), low (3) or very low (4). The concentration of protein in the synovial fluid was determined by means of refractometry and expressed in g/dL. The TNCC was performed using Neubauer's chamber, with distilled water as the diluent, and the results are expressed in TNCC/µL. For cytological analysis, the fluid was centrifuged and the pellet used to make the smear, stained by the rapid panoptic method for differential cell counting [3,22] and evaluation of the degree of erythrophagocytosis.

RNA extraction, reverse transcription and real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR): All primers and probes used in this study were derived from the Equus caballus genome (GenBank) and are shown in Table 1. RNA was extracted from chondrocyte pellets using TRIzol® according to the manufacturer's instructions. RNA quantification was performed using Nano-Drop spectrophotometer and RNA purification evaluated with 260 / 280nm mean absorbance (Thermo Scientific). RNA was treated with amplification degree of 0.1U DNase (Invitrogen) for 15 min at 27°C, followed by inactivation of DNase with 1 µl of EDTA at 65°C for 10 min. Double-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized from 300 ng of total RNA with random hexamer primers using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) according to the manufacturer's instructions. Quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were performed on a CFX384 (BioRad) thermocycler using BRYT Green® dye and from GoTaq® qPCR Master Mix Taq polymerase DNA (Promega Corporation) with 12.5 ng of cDNA in 2 µl. A common program of thermal cycling (initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing / extension at 60°C for 30 seconds) was used to amplify each transcript. Melting curve analyses

were performed to verify the identity of the product. The primers were validated by standard curves and the sequences are described in Table 1. Reactions with coefficient of determination (R2) greater than 0.98 and efficiency between 85 and 110% were considered optimized. Samples were processed in duplicate and the results expressed relative to the levels of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*G3pdh*) and ribosomal protein L4 (*Rpl4*). Data were normalized using sample calibrator using ΔΔCq method as described by Pfaffl (2001) [23]. The relative abundance of each gene was analyzed by ANOVA.

Table 1 - Primer sequences used for RT-qPCR

Gene	Acess Nr.	Sequence of primer
Acan	XM_014733894.1	F – AGACAGCCGTCACAGACCAG
		R – ACGATGCTGCTCAGGTGTGA
Col2a1	NM_001081764.1	F – TGGTGACCCTGGCCTTCAAG
		R – AACGATGCCCCTCTGTCCAG
Ilb1	NM_001082526.1	F – TATGTGTGTGATGCAGCTGTGC
		R – ATGCAGAACACCACTTGTTGG
Il6	NM_001082496.2	F– TCCCTCTTCACAAGCACCGTC
		R – GTCTGCAGTGGTGAGTAGTGGT
Mmp9	NM_001111302.1	F – TCTTCAAGGACGGGAGGTACT
		R – TCCTCAAAGGCGGAATCCAG
Mmp13	NM_001081804.1	F – GAGCACTCATGTTTCCGATCTA
		R – ATGTTTAGGGTTCGGGTCTTC
G3pdh	NM_001163856.1	F - GGTGGAGCCAAAAGGGTCAT
		R - TTCACGCCCATCACAAACAT
Rpl4	XM_001497094.3	F – TTCATCGCAGGGTCCTGAAG
		R – TCCACCCGGAGTTTGTGATTC

Statistical analysis: For evaluation of TNCC, protein and mucin quality test immediately before and after treatment, Wilcoxon test was used. The Kruskal-Wallis test was used to

compare the values of TNCC, protein and mucin quality test in the 24 hours after treatment point between the ropivacaine and saline treated joints. The Mann-Whitney test for independent data was used to compare the gene expression levels of the genes evaluated by qPCR between the ropivacaine and saline treated joints. A significance level of 0.05 was considered for the different analyzes.

RESULTS

Synovial fluid

TNCC values were higher 24 hours after injection of ropivacaine and saline ($p<0.05$) (Figure 1). However, no difference was observed between ropivacaine and saline treatments after 24 hours ($p>0.05$). The TNCC values were 35 ± 81/µL before administration of ropivacaine; 26217 ± 33588 /µL after administration of ropivacaine; 398 ± 436/µL before administration of saline and 2773 ± 3353/µL after administration of saline.

Protein values did not vary at pre and 24 h after infiltration with both ropivacaine and saline ($p>0.05$). There was also no difference between protein values between the joints treated with saline and ropivacaine ($p>0.05$). The protein values were 2.4 ± 0.7 g/dL before administration of ropivacaine; 4.4 ± 1.3 g/dL after administration of ropivacaine; 2.7 ± 1 g/dL before administration of saline and 3.3 ± 0.6 g/dL after administration of saline.

The quality of the mucin precipitate was lower 24 hours after the treatment with ropivacaine ($p < 0.05$). However, there was no difference between the pre and post 24 hour saline and IA ropivacaine and saline treatments.

Synovia

The synovia samples were collected only 24 hours after administration of the treatments**.** The levels of *Ilb1*, *Il6* and *Mmp13* gene expression showed no difference between IA treatments with ropivacaine and saline ($p>0.05$). However, *Mmp9* levels were increased in the joints treated with ropivacaine ($p<0.05$) (Figure 2).

Articular cartilage

Cartilage samples were taken after 24 hours of ropivacaine and saline treatments and no differences were observed in expression levels of *Ilb1*, *Il6*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Acan* and *Col2a1* in cartilage samples ($p>0.05$) (Figure 3).

DISCUSSION

The results of this study demonstrate that IA use of saline and ropivacaine produces a similar inflammatory reaction by increasing TNCC 24 hours after application. However, when comparing the anabolic / catabolic markers of the joints, ropivacaine showed a difference in expression levels only of *Mmp9*. These results suggest that ropivacaine had saline-like effects when in IA use, suggesting safety in IA use of this anesthetic.

In this study, no clinical signs of toxicity were observed within 10 days after the procedure of articular injection and arthroscopy for biopsy collection. The evaluation of toxic manifestations of IA drugs was performed by lameness evaluation, regional palpation, presence of local heat, reduction of joint angle of flexion, as suggested by the literature [4,24]. Similarly, Martin & McIlwraith (1986) [25] did not observe changes suggestive of toxicity after administration of saline in carpi of horses; however, after administration of lactated Ringer's solution in the deep digital flexor tendon sheath, Dykgraaf et al. (2007) [26]

observed variable lameness grades. According to the clinical evaluation, both IA saline and ropivacaine administration did not cause clinical manifestations of toxicity.

The interval between administration and sample collection was 24 hours, as suggested by White et al. (1989) [27], which claim to be the most sensitive sampling time to detect changes caused by a given IA treatment. Regarding the analysis of biomarkers, Piat et al. (2012) [5], after administration of bupivacaine, lidocaine or saline IA in horses, demonstrated that between six and 24 hours a decrease in collagen markers was observed. This moment seems to be a good time for collection of synovial fluid and samples of joint tissues.

Comparing the synovial fluid of the pre and post treatment, the IA administration of ropivacaine and saline promoted an increase in TNCC ($p<0.05$). After 24 hours of administration of ropivacaine and saline, there was high variability in TNCC, however no difference was observed between treatments. A TNCC less than 1.0×10^9/L is generally considered within normal limits, with many such samples having less than 0.2×10^9/L [28]. It is well known that after the use of local anesthetics can occur a chemical synovitis, also known as “flare” [28]. In addition, several authors described that synoviocentesis of an equine joint or even injection of saline can produce a significant increase in the TNCC count (5 a 40 $\times 10^9$/L) [24,25,29-31]. It is also known that some intra-articular injections for therapeutic purposes may elicit an inflammatory reaction with clinical signs and synovial changes that may mimic infectious arthritis [25,31]. In this study, erythrocytes were frequently observed after 24 hours of treatment, they are not considered normal constituents of synovial fluid; however, this is usually attributed to blood contamination during sample collection and synovial inflammation [28]. Regarding the use of local anesthetics in the IA route, White et al. (1989) [27], observed that lidocaine and mepivacaine were irritating to the synovial environment; and despite of serial arthrocentesis causing an increase in TNCC, cellularity was still higher in the joints treated with local anesthetics. Another contributing factor to the

adverse effects of local anesthetics can be attributed to the vehicles used to dilute these drugs [5]. Corroborating with the aforementioned literature, our hypothesis is that the number of TNCC in this study was influenced by both the repeated arthrocentesis and the IA use of saline and ropivacaine, which apparently were somehow irritating to the joint environment.

Due to the low cellularity in the synovial samples during the first arthrocentesis, it was not possible to make a comparison regarding the predominance of the cells between evaluation times, however after 24 hours neutrophils were found in percentage greater than 62%, with some cells presenting signs of degeneration. Normal synovial fluid contain low numbers of nucleated cells ($<1x10^9$/L), mostly which are mononuclear cells. Neutrophils usually constitute less than 10% of the TNCC; nevertheless, an increase in neutrophil counts is not uncommon in traumatic synovitis [28]. Previous studies in horses have shown that IA administration of saline solution produces an increase in neutrophil count [25,31], demonstrating the presence of an acute inflammatory process. In addition, any substance, other than corticosteroids, will be inflammatory when injected into the pristine synovial space [25]. Furthermore, serial arthrocentesis and sample contamination by blood may also be a potential factor for increased neutrophils in the synovial fluid [24].

The IA treatments with saline and ropivacaine did not cause an increase in protein levels, in the same way protein levels after treatment with saline and ropivacaine did not vary ($p>0.05$). The mean values of protein before treatment with ropivacaine and saline were 2.4 ± 0.7 g/dL and 2.7 ± 1 g/dL respectively; after 24 hours of treatment with ropivacaine and saline were 4.4 ± 1.3 g/dL and 3.3 ± 0.6 g/dL, respectively. These values are higher than the reference values cited by literature, generally, a value less than 2 g/dL is considered normal and values greater than 4 g/dL may indicate severe inflammation [28]. It is known that joint inflammation leads to an increase in protein levels [28], and the administration of IA substances and serial arthrocentesis are contributing factors [24,25,29-31]. Since the increase

in protein is due to increased synovial permeability and vessel damage [28], contamination of blood samples may also interfere with the results [31]. Differently from what was observed in our study, Martin & McIlwraith (1986) [25] stated that saline IA is also able to increasing protein levels in the synovial fluid. However, White et al. (1989) [27] claimed that both lidocaine and mepivacaine are not able to raise protein levels. Although no difference was observed between the treatments and time points of evaluation of the synovial fluid, the protein values are above the reference values, which probably were caused by an association of the irritant potential of treatments, repeated synoviocentesis and blood contamination of samples.

A decrease in mucin quality was seen after treatment with ropivacaine, this fact was not observed with saline treatment. In controversy, White et al. (1989) [27] observed that mucin quality remained unchanged after IA administration of lidocaine and mepivacaine. Mucin precipitation test evaluates the quality and quantity of synovial fluid mucin and provides a gross estimation of the hyaluronic acid concentration and degree of polymerization [28,21]. Therefore, the poor mucinous precipitate quality is characteristic of marked inflammation [31]. The results of previous studies demonstrate that serial arthrocentesis are not able to alter the quality of mucin [24], unlike of IA use of saline, which reduces the quality of the precipitate [31]. According to our results, IA use of ropivacaine is able to modify the amount of hyaluronic acid in the synovial fluid observed through the stability of mucin quality; this result reflects inflammation following drug administration.

After 24 hours of treatment, no differences were found between levels of *Ilb1* expression between the joints treated with saline and ropivacaine. *Il1* is the main cytokine involved in OA and directly influences levels of *MMP-13* and *IL-6*, responsible for type II collagen cleavage [32]. Studies with *in vitro* cultured synoviocytes demonstrated that these cells are not able to produce IL-1, and in *in vivo* situations the *IL-1* increase can be result of

the macrophages production [33]. Additionally, in equine OA joints *Il1* levels are increased [34] and that this cytokine nullifies the homeostatic function of synovia by stimulating the production of inflammatory mediators and degradative enzymes [33]. Even the results of this study do not reflect the *Ilb1* profile before and after treatment, but compared to saline, commonly used by the joint pathway, ropivacaine appears to be safe in IA use.

The similarity of *Il6* expression levels between saline and ropivacaine treatments in synovia and cartilage samples may be related to the same levels of *Ilb1* expression in these tissues. In synovial fluid, *Il6* as an excellent predictor of joint disease in general [32]. However, data from cultured synoviocytes demonstrated that *IL-6* is not produced by these cells and in the articular environment the increase levels of *IL-6* may correlate primarily with inflammatory cell infiltrates [33]. By suggesting an anti-inflammatory effect of ropivacaine, Yao et al. (2018) [18] demonstrated, through IA administration in OA mice model, suppression of *Il6* levels after seven days after treatment this downregulation was attributed to the regulation of nuclear factor of activated T-cells1 (NFAT1) and calciferin. In our study it was not possible to evaluate the anti-inflammatory effects of ropivacaine, since there was no previous inflammatory stimulus other than arthrocentesis and administration of the drugs.

The expression levels of *Mmp9* were higher in the synovia of joints treated with ropivacaine than those treated with saline ($p<0.05$). It has already been shown that *Mmp9* levels in degenerate equine joints, and its production has been attributed to chondrocytes and synovial membrane, being suggested as a biomarker of joint disease [35]. In the same way, after 24 hours of exposure of synoviocytes to bupivacaine, Braun et al. (2013) [33] observed an increase in *MMP-9* levels, suggesting that the presence of *IL-6* and *IL-1β in vivo* may amplify the inflammatory mediator expression. In contrast, in our study, even without difference in *Ilb1* and *Il6* expression in saline and ropivacaine treatments,

Cartilage samples showed no difference between *Mmp9* levels between treatments, whereas *Mmp9* levels were higher in ropivacaine-treated synovium samples. Chondrocytes are the only constituent cells of cartilage [32] and are protected by the extracellular matrix of physical and chemical stimuli [9]. One hypothesis is that in our work the matrix has protected the chondrocytes from direct contact with ropivacaine, which may explain the same levels of *Mmp9* found in saline treatments. Additionally, it plausible that local anesthetics may initiate an indirect cartilage injury pathway by activating synovial cells, resulting in the release of MMPs that amplify chondrotoxicity and matrix dissolution occurring after intra-articular administration [33]. Due to their proteolytic effects, MMPs have been widely implicated in cartilage death and osteoarthritis [33]. In this study a single comparative measurement of *Mmp9* levels was made, the increase of this enzyme after treatment may have been transitory, however for such a result a synovial serial evaluation would be necessary to elucidate this statement.

The maintenance of joint homeostasis can also be explained by the similarity in the levels of *Mmp13* expression in synovia and cartilage samples between saline and ropivacaine treatments, probably reflecting *Ilb1* levels also expressed between treatments. In turn, in equine OA joints, the synovia and cartilage express high levels of *Mmp13* [34]. However, the activity of MMPs is also age-regulated, in view of that in adult horses (age > 4 years) the activity is low [36]; we hypothesize that this is not a contributing factor for the animals in this study, since all were older than 11 years. *MMP-13* is strongly involved in cleavage of type II collagen, however, as the expression levels of this enzyme did not vary between treatments, as the expectancy also did not differ between collagen levels.

Reflecting the aforementioned results in cartilage evaluations, there were no differences in the levels of aggrecan and collagen type II of the cartilage samples treated with ropivacaine. Differently, after IA administration of bupivacaine or lidocaine in horses, Piat et

al., (2012) [5] observed a significant difference in aggrecan and type II collagen levels when compared to IA administration of saline, one of the hypotheses is that the increase of these biomarkers synthesis is associated with an increase in the degradation of collagen in the cartilage. Recent studies demonstrated the anti-inflammatory effects of ropivacaine IA in rats with OA, which was able to restore joint homeostasis through stabilization in aggrecan and type II collagen levels [18]. Comparing our results with the literature data, it is suggested that ropivacaine is a safer drug than lidocaine and bupivacaine for IA use. Considering that no previous inflammatory stimulus has been established, its anti-inflammatory effect cannot be predicted.

This study has some limitations, such as the dose used, which was based on the dosages used in the clinical routine, since there are no predefined doses for IA use in horses. It is known that the toxicity of ropivacaine is dependent on the concentration and time of exposure to the drug [15]. Initially the joint was exposed to a high dose of ropivacaine and over time was diluted by the synovial fluid. There is no evidence in horses that demonstrate the pharmacokinetics of IA ropivacaine use, however studies in dogs demonstrated that after 30 minutes of infusion with bupivacaine, only 11% of the initial concentration was observed, suggesting rapid clearance [37]. In the analysis of synovial fluid and increase of TNCC, it is not possible to predict safely whether TNCC after serial arthrocentesis reflects the joint cellularity or it is the result of blood contamination of the sample [31]. Another limitation refers to the result of the biomarkers, since a collection of pre-treatment biopsies was not performed, it was not possible to make a comparison between moments; instead, only comparison between treatments. In addition, the previous collection would damage the joint tissues and modify the results.

With the results obtained we evaluated ropivacaine as a safe drug for IA use. Both saline and ropivacaine administration appear to generate an inflammatory response, although

only treatment with ropivacaine appears to be able to alter the quality of mucin in the synovial fluid. We observe, as well as Van Weeren (2016) [38], that the articular components are related to each other, so that injury to one of its constituents will potentially harm others. Therefore, the maintenance of joint homeostasis, suggested by similarity in assessments of saline treated joints, was obtained through evaluations of *Ilb1*, *Il6*, *Mmp13*, *Acan* and *Col2a1*. Although *Mmp9* levels in cartilage were similar between treatments, synovia levels of *Mmp-9* were increased in ropivacaine treatments, suggesting that only synovia was stimulated. To the authors' knowledge, this is the first study with the use IA of ropivacaine in healthy equine joints. New studies are suggested to evaluate the effects of ropivacaine over time and also in OA joints.

CONCLUSIONS

The administration of saline and ropivacaine in the tibiotarsal joint causes inflammation of the synovial fluid. However differences between anabolic and catabolic cartilage markers are not observed between treatments. Only *Mmp9* levels in synovium were increased after ropivacaine treatment, suggesting close contact.

Source of founding

This study was funded by FATEC/UFSM (Grant 5.03.0025) and by FAPERGS/CAPES.

MANUFACTURERS' ADDRESSES

[a] Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brazil

[b] Halex Istar, Goiânia, Brazil

[c] J.A. Saúde Animal, Patrocínio Paulista, Brazil.

[d] Vetnil, Louveira, Brazil

[e] Syntec, Santana de Parnaíba, Brazil

[f] União Química, Embu-Guaçu, Brazil

[g] Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brazil

[h] Ceva, Paulínia, Brazil

[i] Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda., Anápolis, Brazil

LIST OF FIGURE LEGENDS

Figure 1: Graphs showing: A) TNCC of the synovial fluid of saline-treated joints at pre and post treatment times (different letters show difference) ($p < 0.05$); B) TNCC of the synovial fluid of joints treated with ropivacaine at the moments before and after treatment (different letters show difference) ($p < 0.05$); C) total protein values of synovial fluid of joints treated with saline at the moments before and after treatment ($p > 0.05$); D) total protein values of the synovial fluid of joints treated with ropivacaine at the moments before and after treatment ($p > 0.05$); E) evaluation of the mucin quality of the synovial fluid of joints treated with saline at the moments before and after treatment ($p > 0.05$); F) evaluation of the mucin quality of the synovial fluid of joints treated with saline at the moments before and after treatment (different letters show difference) ($p < 0.05$).

Figure 2: Gene expression of synovium of joints treated with saline and ropivacaine, A) levels expression of IL-1 ($p > 0.05$); B) levels expression of IL-6 ($p > 0.05$); C) levels expression of MMP-9 (different letters show difference) ($p < 0.05$); D) levels expression of MMP-13 ($p > 0.05$).

Figure 3: Gene expression of cartilage of joints treated with saline and ropivacaine, A) levels expression of IL-1 ($p > 0.05$); B) levels expression of IL-6 ($p > 0.05$); C) levels expression of MMP-9 (different letters show difference) ($p > 0.05$); D) levels expression of MMP-13 ($p > 0.05$); E) levels expression of agrecan ($p > 0.05$); F) levels expression of collagen type II ($p > 0.05$).

REFERENCES

[1] Rossdale, P.D., Hopes, R., Digby, N.J. and Offord, K. (1985) Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet. Rec*. **116**, 66-9.

[2] United States Department of Agriculture - USDA. Lameness and Laminitis in US Horses. Fort Colins, 2000.

[3] McIlwraith, C.W. and Trotter, G.W. (1996) Clinical features and diagnosis of equine joint disease. In: *Joint disease in the horse*, Eds: McIlwraith, C. W. and Trotter, G. W. Saunders, Philadelphia, pp 120-144.

[4] Santos, L.C.P., Moraes, A.N. and Saito, M.E. (2009) Effects of intraarticular ropivacaine and morphine on lipopolysaccharide-induced synovitis in horses. *Vet. Anaest. Analg*. **36**, 280–286.

[5] Piat, P., Richard, H., Beauchamp, G. and Laverty, S. (2012) In Vivo Effects of a Single Intra-Articular Injection of 2% Lidocaine or 0.5% Bupivacaine on Articular Cartilage of Normal Horses. *Vet. Surg*. **41**, 1002-1010.

[6] Harkins, J.D., Karpiesiuk, W., Woods, W.E., Lehner, A., Mundy, G.D., Rees, W.A., Dirikolu, L., Bass, S., Carter, W.G., Boyles, J. and Tobin, T. (1999) Mepivacaine: its pharmacological effects and their relationship t analytical findings in the horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther*. **22**, 107-121.

[7] Harkins, J.D., Karpiesiuk, W., Lehner, A., Woods, W.E., Dirikolu, L., Carter, W.G., Boyles, J. and Tobin, T (2001). Ropivacaine in the horse: its pharmalogical responses, urinary detection and mass spectral confirmation. *J. Vet. Pharmacol. Ther*. **24**, 89-98.

[8] Bolt, D.M., Ishihara, A., Weisbrode, S.E. and Bertone, A.L. (2008) Effects of triamcinolone acetonide, sodium hyaluronate, amikacin sulfate, and mepivacaine hydrochloride, alone and in combination, on morphology and matrix composition of lipopolysaccharide-challenged and unchallenged equine articular cartilage explants. *Am. J. Vet. Res*. **69**, 861-867.

[9] Park, J., Sutradhar, B.C., Hong, G., Choi, H.C. and Kim, G. (2011) Comparison of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine in equine articular chondrocytes. *Vet. Anaest. Analg*. **38**, 127–133.

[10] Schumacher, J., Schramme, M.C., Schumacher, J. and DeGraves, F.J. (2013) Diagnostic analgesia of the equine digit. *Equine Vet. Educ*. **25**, 408-421.

[11] Silva, G.B, De La Côrte, F.D., Brass, K.E., Azevedo, M.S., Dau, S., Ceni, F. and Lopes, L.F.D. (2015) Duration and efficacy of different local anesthetics on the palmar digital nerve block in horses. *J. Equine Vet. Sci*. **35**, 749-755.

[12] Piper, S.L. and Kim, H.T. (2008) Comparison of Ropivacaine and Bupivacaine Toxicity in Human Articular Chondrocytes. *J. Bone Joint Surg*. **90**, 96-991.

[13] Dragoo, J.L., Korotkova, T., Kim, H.J. and Jagadish, A. (2010) Chondrotoxicity of Low pH, Epinephrine, and Preservatives Found in Local Anesthetics Containing Epinephrine. *Am. J. Sport Med.* **38**. 1154-159.

[14] Baker, J.F. and Mulhall, K.L. Local anaesthetics and chondrotoxicty: What is the evidence? (2012) *Knee Surg. Sport Tr. A*. **20**, 2294–2301.

[15] Breu, A., Rosenmeier, K., Kujat, R., Angele, P. and Zink, W. (2013) The cytotoxicity of bupivacaine, ropivacaine, and mepivacaine on human chondrocytes and cartilage. *Anesth. Analg*. **117**, 514-522.

[16] Chu, C.R., Izzo, N.J., Papas, N.E. and Fu, F.H. (2006) In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. *Arthroscopy*. **22** (7), 693-699.

[17] Rubio-Martínez, L.M., Rioja, E., Martins, M.C., Wipawee, S., Clegg, P. and Peffers, M.J. (2017) Local anaesthetics or their combination with morphine and/or magnesium sulfate are toxic for equine chondrocytes and synoviocytes in vitro. *BMC Vet. Res*. **13**, 1-8.

[18] Yao, W., Han, Q., Wang, L. and Niu, Z. (2018) Ropivacaine relieves pain and prevents chondrocyte degradation probably through Calcineurin/NFAT1 signaling pathway in osteoarthritis rats. *Eur. J. Pharmacol*. **818**, 518–524.

[19] Baxter, G.M. (2011) Diagnostic procedures. In: *Adams & Stashak's lameness in horse*, 6th edn., Ed: G.M. Baxter, Wiley-Blackwell, UK, pp.207-468,

[20] McIlwraith, C. W., Wright and I. Nixon, A.J. (2014). In: *Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse*. 4th edn., Ed: C. W. McIlraith, I. Wright and A. J. Nixon, Mosby, p. 464.

[21] Van Pelt, R. W. (1974) Interpretation of synovial fluid findings in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. **165**, 91-95.

[22] Mahaffey, E. A. (2002) Synovial fluid. In: *Diagnostic Cytology and hematology of the horse*, 2nd edn, Ed: R. L._Cowell and D.R. Tyler, American Veterinary Publications, pp. 153-161.

[23] Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. **29**, 2000-2007.

[24] Pozzobon, R., Brass, K.E., Fighera, R.A. and De La Corte, F.D. Características físico-químicas e citológicas do líquido sinovial de pôneis com modelo de sinovite induzida. *Ci. Anim. Bras*. **10,** 1303-1309.

[25] Martin, G.S. and McIlwraith, C.W. (1986) Effect of intra-articular injection of ontosein and saline solution on equine synovia. *Equine Vet. Sci*. **6**, 120-123.

[26] Dykgraaf, S., Dechant, J.E, Johns, J.L, Christopher, M.C., Bolt, D.M. and Snyder, J.R. (2007) Effect of intrathecal amikacin administration and repeated centesis on digital flexor tendon sheath synovial fluid in horses. *Vet. Surg*. **26**, 57-63.

[27] White, K.K, Hodgson, D.R., Hancock, D., Parry, B.W. and Cordell, C. (1989) Changes in equine carpal joint synovial fluid in response to the injection of two local anesthetic agents. *Cornell Vet*. **79**, 25-38.

[28] Steel, C.M. (2008) Equine synovial fluid analysis. *Vet. Clin. North Am. Equine*. **24**, 437-454.

[29] Wagner, A.E., McIlwraith, C.W. and Martin, G.S. (1982) Effect of intra-articular injection of orgotein and saline solution on equine synovia. *Am. J. Vet. Res*. **43**, 594-597.

[30] Stover S.M. and Pool, R.R. (1985) Effect of intra-articular gentamicin sulfate on normal equine synovial membrane. *Am. J. Vet. Res*. **46**, 2485-2491.

[31] Tulamo, R.M., Bramlage, L.R. and Gabel, A.A. (1989) Sequential clinical and synovial fluid changes associated with acute infectious arthritis in the horse. *Equine Vet. J*. **21**, 325-331.

[32] Frisbie, D. D., McIlwraith, C. W. and Grauw, J.C. (2016) Synovial Fluid and Serum Biomarkers. In: *Joint disease in the horse*, 2nd edn., Ed: C.W. McIlwraith, D. Frisbie, C. Kawcak and R. Van Weeren, Saunders, Philadelphia, pp. 33–48.

[33] Braun, H. J., Busfield, B. T., Kim, H. J., Scuderi, G. J. and Dragoo, J. L. (2012) The effect of local anaesthetics on synoviocytes: a possible indirect mechanism of chondrolysis. *Knee Surg. Sport Tr. A.* **21**, 1468–1474.

[34] Kamm, J.L., Nixon, A.J. and Witte, T.H. (2010) Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpie. *Equine Vet. J*, **42**, 693-699.

[35] Clegg, P. D., Coughlan, A.R., Riggs, C.M. and Carter, S.D. (1997) Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet. J.* **29,** 343-348.

[36] Brama, P.A.J., Tekoppele, J.M., Beekman, B., Van Weeren, P.R and Barneveld, A. (1998) Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis, and osteochondrosis. *Ann. Rheum. Dis*. **57**, 697-699.

[37] Barry, S.L., Martinez, S.A., Davies, N.M., Remsberg, C.M., Sayre, L. and Bachele, Z.A. (2015) Synovial fluid bupivacaine concentrations following single intra articular injection in normal and osteoarthritic canine stifles. *J. Vet. Pharmacol. Ther*. **38**, 97-100.

[38] Van Weeren, P.R. General anatomy and physiology of joint. In: (2016) Synovial Fluid and Serum Biomarkers. In: *Joint disease in the horse*, 2nd edn., Ed: C.W. McIlwraith, D. Frisbie, C. Kawcak and R. Van Weeren, Saunders, Philadelphia, pp. 1-24.

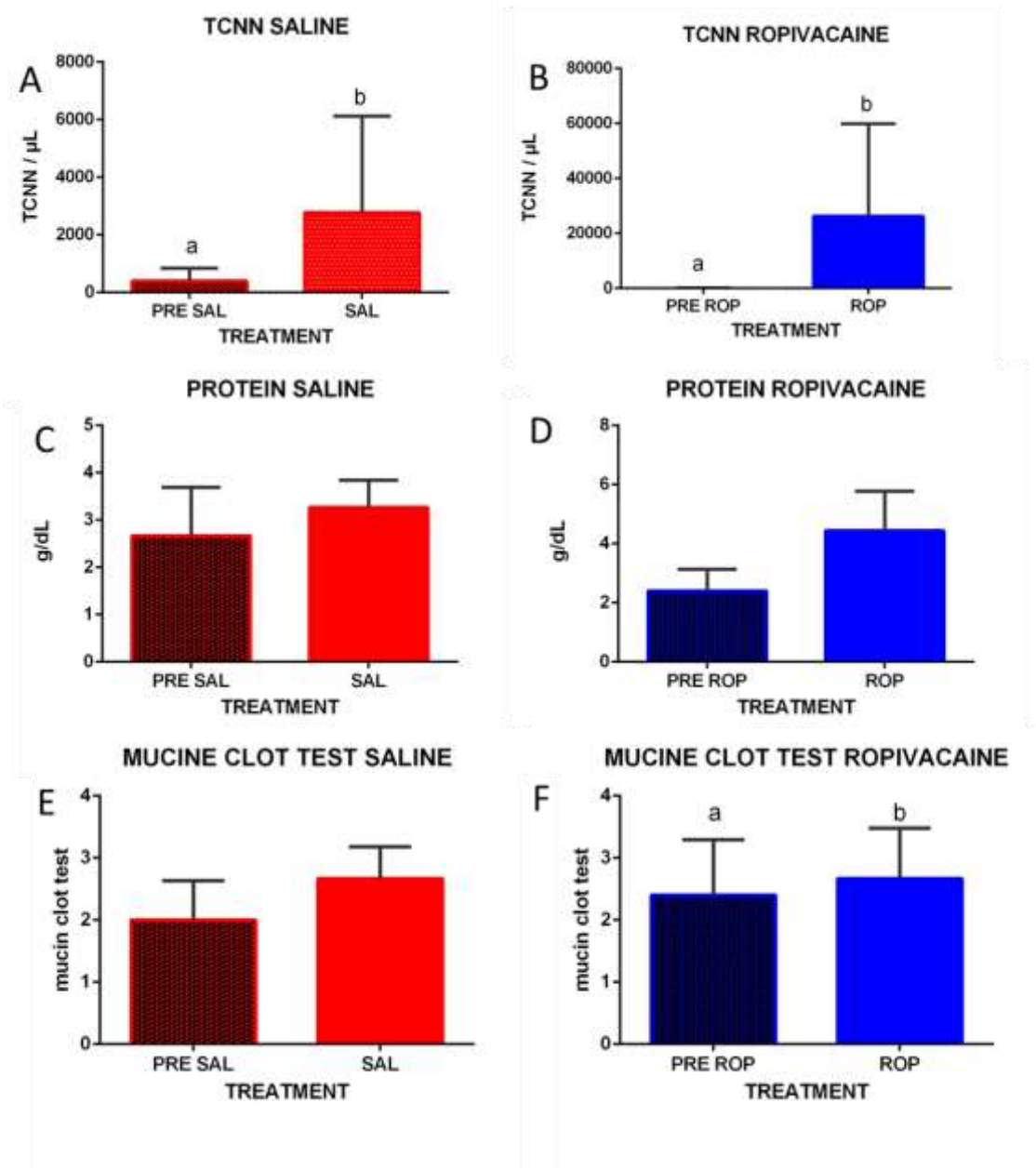

Figure 1: Graphs showing: A) TNCC of the synovial fluid of saline-treated joints at pre and post treatment times (different letters show difference) ($p < 0.05$); B) TNCC of the synovial fluid of joints treated with ropivacaine at the moments before and after treatment (different letters show difference) ($p < 0.05$); C) total protein values of synovial fluid of joints treated with saline at the moments before and after treatment ($p > 0.05$); D) total protein values of the synovial fluid of joints treated with ropivacaine at the moments before and after treatment ($p > 0.05$); E) evaluation of the mucin quality of the synovial fluid of joints treated with saline at the moments before and after treatment ($p > 0.05$); F) evaluation of the mucin quality of the

synovial fluid of joints treated with saline at the moments before and after treatment (different letters show difference) ($p < 0.05$).

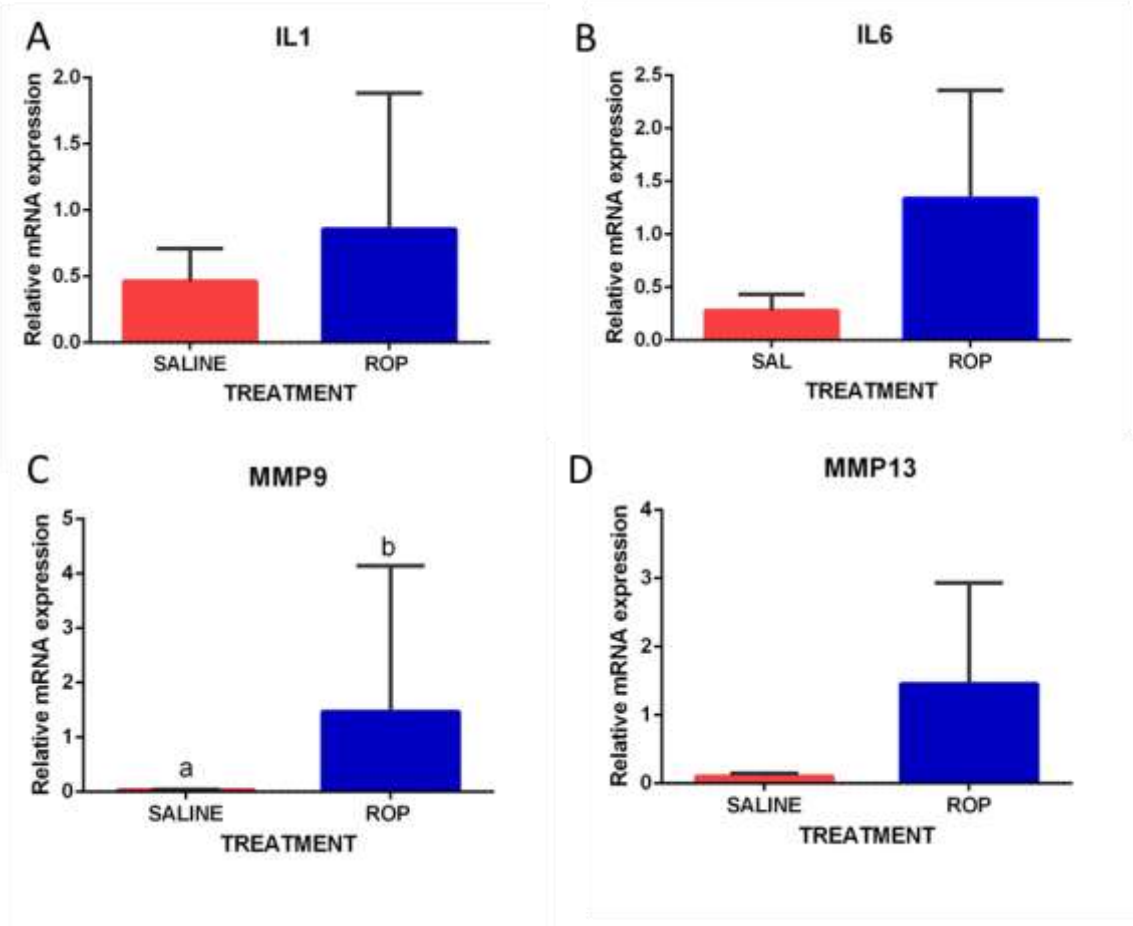

Figure 2: Gene expression of synovium of joints treated with saline and ropivacaine, A) levels expression of IL-1 ($p > 0.05$); B) levels expression of IL-6 ($p > 0.05$); C) levels expression of MMP-9 (different letters show difference) ($p < 0.05$); D) levels expression of MMP-13 ($p > 0.05$).

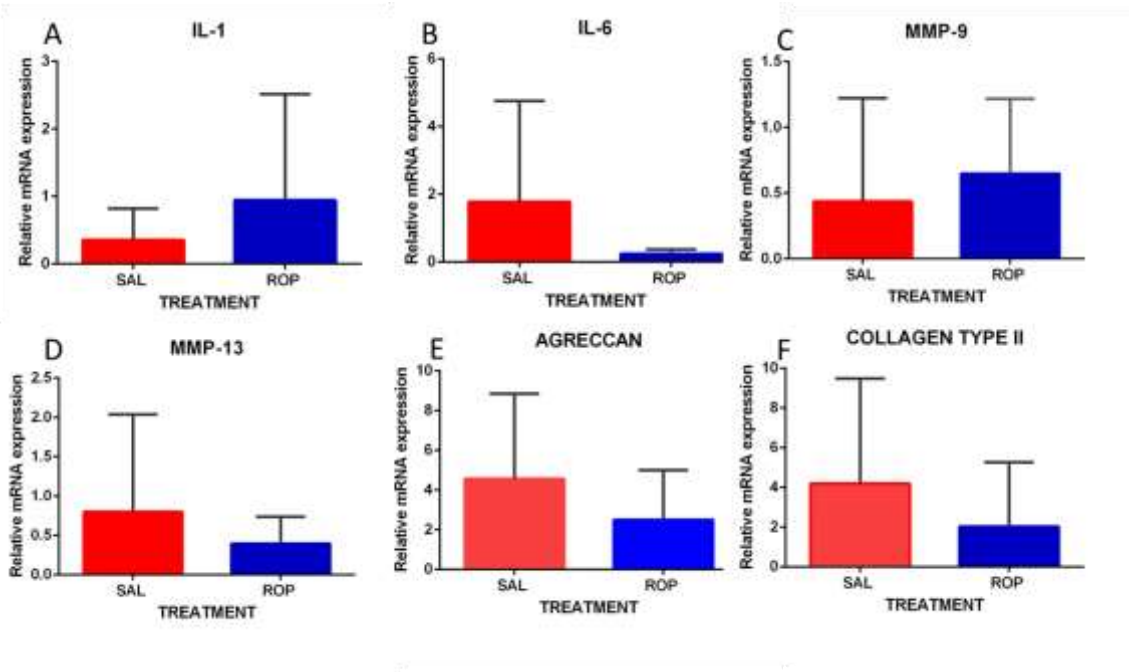

Figure 3: Gene expression of cartilage of joints treated with saline and ropivacaine, A) levels expression of IL-1 ($p > 0.05$); B) levels expression of IL-6 ($p > 0.05$); C) levels expression of MMP-9 (different letters show difference) ($p > 0.05$); D) levels expression of MMP-13 ($p > 0.05$); E) levels expression of agrecan ($p > 0.05$); F) levels expression of collagen type II ($p > 0.05$).

6. DISCUSSÃO

As doenças articulares representam grande parte da casuística da clínica e medicina esportiva de equinos e, na maioria dos casos, os danos na cartilagem são identificados como um importante fator contribuinte (ROCHA JUNIOR et al., 2016). O exame de claudicação em equinos é feito, primariamente, através do exame clínico, e inclui o uso de agentes anestésicos IAs que permitem identificar com precisão a origem da dor (SANTOS et al., 2009). Da mesma forma, a administração IA também é um procedimento comumente usado para analgesia pós-operatória (PIAT et al., 2012). Contudo os anestésicos locais podem ser tóxicos para os condrócitos e devem ser usados com cautela, visto que a perda de condrócitos está implicada no desenvolvimento da artrite.

A mepivacaína é o fármaco mais usado nos bloqueios IA em equinos por veterinários ao redor do mundo e estudos prévios com condrócitos equinos demonstraram que a mepivacaína possui menor condrotoxicidade quando comparada a lidocaína e bupivacaína (PARK et al., 2011). Contudo o uso da mepivacaína não é livre de complicações e pode induzir morte de condrócitos (BOLT, 2008), levando à necessidade da realização de trabalhos que identifiquem anestésicos com menor potencial tóxico no ambiente articular. Adicionalmente, uma das principais limitações do uso da mepivacaína para o uso rotineiro no Brasil é o difícil acesso a esta droga, visto que inexiste uma preparação para uso equino no mercado nacional. O difícil acesso a mepivacaína em doses e concentrações adequadas e o fato da ropivacaína produzir menores taxas de morte de condrócito do que a mepivacaína em humanos (BREU et al, 2013), serviram de motivação e argumento para o desenvolvimento de pesquisas com deste anestésico em articulações de equinos. A fim de comprovar a segurança do uso deste fármaco em equinos foram feitas avaliações *in vitro* seguidas de avaliações *in vivo*.

Para avaliação *in vitro* da ropivacaína foram estabelecidos cultivos monocamada e tridimensional em pellets. Os cultivos foram adaptados de acordo com a literatura e materiais disponíveis no laboratório, sendo tanto o cultivo em monocamada e pellets de fácil obtenção e manutenção, sendo facilmente reprodutíveis. Observamos, assim como cita a literatura, que os cultivos em monocamada alteram seu perfil fenotípico e os condrócitos adotam aspecto fibroblastóide (STEWART et al., 2000; ZHANG, 2004; OTERO et al., 2005; AHMED, 2007), diferentemente os pellets mantém o aspecto circular e fenótipo característica (OTERO et al., 2005; AHMED, 2007).

Observamos, em cultivos monocamada, através do método de MTT e citometria de fluxo, que após 30 minutos de exposição à ropivacaína apresentou menores taxas de morte celular que a mepivacaína, fármaco de eleição para uso IA em equinos. Conforme esperado, estes resultados demonstraram similaridade com avaliações da ropivacaína e mepivacaína em condrócitos humanos (BREU et al., 2013), sugerindo a ropivacaína como um anestésico mais seguro.

Atualmente, considera-se o uso de marcadores bioquímicos como a grande promessa para detectar mudanças ainda nos estágios iniciais da degeneração articular e pode fornecer informações úteis para avaliar a integridade da cartilagem antes que ocorram mudanças irreversíveis na articulação (BRAMA et al., 1998; FRISBIE et al., 2016). Sabendo que outras reações podem acontecer, que não a morte celular, para avaliação dos fatores anabólicos da cartilagem, agrecan e colágeno tipo II, e catabólicos, IL-1, IL-6, MMP-9 e MMP-13, os pellets de condrócitos foram expostos a 30 minutos de tratamento com ropivacaína 10 mg/ml e mepivacaína 20 mg/ml, os resultados foram comparados ao tratamento dos pellets com meio condrogênico. Observamos que a curta exposição pellets de condrócitos equinos à ropivacaína e à mepivacaína não foi capaz de influenciar a expressão de agrecan, colágeno tipo II e MMP9. Adicionalmente, os resultados sugerem que a ropivacaína e mepivacaína exerçam ação anti-inflamatória e regulem negativamente os níveis de MMP-13, assim como descrito por YAO et al. (2018). Aparentemente, a ausência de meio condrogênico comprometeu a avaliação da IL-6 (GUERNE et al, 1990), inviabilizando a avaliação desta citocina.

Mesmo a ropivacaína apresentando bons resultados nas avaliações *in vitro*, observou-se a necessidade da avaliação *in vivo* deste fármaco, visto que a dificuldade em mimetizar o ambiente articular. Para isso o uso da ropivacaína 10 mg/ml foi comparado ao tratamento IA com solução salina NaCL 0,9%, comumente usada pela via IA para diluição de medicamentos ou mesmo para lavagem articular. Após a IA com ropivacaína e solução salina observou-se inflamação no líquido sinovial, contudo similar entre os tratamentos. Embora apenas o tratamento com ropivacaína pareça ser capaz de alterar a qualidade da mucina no líquido sinovial, não foi observada diferença entre este tratamento e salina. A inflamação foi observada no líquido sinovial através do aumento da contagem de células nucleadas nos momentos pré e pós-tratamento. Este resultado pode refletir efeito da artrocentese, da toxicidade dos fármacos (WAGNER, 1982; McILWRAITH and MARTIN 1986; STOVER and POOL 1985, TULAMO et. al, 1989; POZZOBON et al., 2009), ou ainda contaminação com sangue das amostras durante a coleta (STEEL, 2008).

Através das análises de qPCR, nas amostras de cartilagem colhidas 24 horas após os tratamentos com ropivacaína e salina, não foram observadas diferenças entre os marcadores anabólicos / catabólicos. Apenas os níveis de MMP-9 nas biópsias da sinóvia foram aumentados após tratamento com ropivacaína, sugerindo um resultado do contato íntimo do tecido com o anestésico. Já foi demonstrado que os níveis de MMP-9 em articulações degeneradas de equinos e sua produção, tem sido atribuída a condrócitos e membrana sinovial, sendo sugerido como um biomarcador da doença articular (CLEGG et al, 1997). Outra hipótese sobre o aumento de MMP-9 exclusivo na sinóvia é que a matrix extracelular, responsável por proteger os condrócitos de estímulos químicos e físicos (PARK et al., 2011), tenha servido de barreira ao contato direto dos condrócitos com a ropivacaína. Além disso, é plausível que os anestésicos locais possam iniciar uma via indireta de lesão da cartilagem pela ativação de células sinoviais, resultando na liberação de MMPs que amplificam a condrotoxicidade e a dissolução da matriz que ocorre após a administração intra-articular (BRAUN et al., 2013).

Com os resultados obtidos através da avaliação de viabilidade celular, avaliação de marcadores anabólicos e catabólicos da cartilagem *in vitro* e avaliação do efeito *in vivo*, avaliamos a ropivacaína como droga segura para o uso de IA. Além de demonstrar menor taxa de morte de condrócito que a mepivacaína, a ropivacaína não alterou a homeostase *in vitro*. Os resultados *in vivo* demonstram que a ropivacaína possui efeitos semelhantes aos da administração IA de solução salina, apresentando similaridade entre avaliação de fatores anabólicos / catabólicos nas amostras de cartilagem e sinóvia. Assim como descrito por VAN WEEREN (2016), os componentes articulares estão relacionados entre si, de modo que a lesão de um dos seus constituintes prejudicará outros. Portanto, a manutenção da homeostase articular, sugerida pela similaridade nas avaliações das articulações salinas, foi obtida por meio de avaliações de IL-1, IL-6, MMP-13, agrecan e colágeno tipo II. No conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo com o uso de IA de ropivacaína em articulações saudáveis de equinos, o que traz sugerem-se novos estudos avaliando os efeitos da ropivacaína ao longo do tempo e também em articulações com OA.

7. CONCLUSÕES

Mediante o desenvolvimento e adaptação de técnicas de cultivo de condrócitos foi possível avaliar os efeitos da ropivacaína em condrócitos equinos tanto *in vitro* como *in vivo*. Através de cultivos em monocamada e avaliação de viabilidade celular foi possível identificar a ropivacaína como uma alternativa anestésica segura. Estes resultados foram comprovados pela avaliação de marcadores em cultivos tridimensionais em pellets, que sugeriu efeitos anti-inflamatórios dos cultivos expostos à ropivacaína. Por fim a avaliação *in vivo* da ropivacaína demonstrou que a droga demonstra efeitos inflamatórios similares ao uso da solução salina na via IA, sugerindo manutenção da homeostase celular. Através de diferentes métodos de avaliação de toxicidade sugerimos a ropivacaína como um fármaco seguro para aplicação IA em equinos.

8. REFERÊNCIAS

AHMED, Y. A. G. **Analysis of physiological death in equine chondrocytes**, PhD thesis, School of Veterinary Science, University of Melbourne, 2007. Disponível em: https://minerva-access.unimelb.edu.au/bitstream/handle/11343/39266/67399_00003656_01_Yasser_thesis.pdf?sequence=1. Acesso em 14 fev. 2017.

(a) AHMED, Y. A. et al. Hypertrophy and physiological death of equine chondrocytes *in vitro*. **Equine Veterinary Journal**, v. 39 (6), p. 546-552, 2007.

AL-SABAH, A. et al. Importance of reference gene selection for articular cartilage mechanobiology studies. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24(4), p. 719-730, 2016.

AYERS D. et al. Expression stability of commonly used reference genes in canine articular connective tissues. **BMC Veterinary Research**, p.3-7, 2007.

BAKER, J.F et al. Human chondrocyte viability after treatment with local anaesthetic and/or magnesium: results from an *in vitro* study. **Arthroscopy**, v. 27, p. 213–217, 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952146. Acesso em: 13 fev. 2017

BAKER, J.F.; MULHALL, K.J. Local anaesthetics and chondrotoxicity: what is the evidence? **Knee Surgery Sports Traumatology Arthrosco**py, v. 20, p. 2294–2301, 2012. Disponível em: http://link.springer.com/article/10.1007/s00167-011-1804-6. Acesso em: 13 fev. 2017.

BACH, J. F.; CHATENOUD, L. **Immunologie**. 6 édition, Ed. Médecine Sciences Flammarion. Paris 2002.

BAUER, D.C. et al. OSTEOARTHRITIS BIOMARKERS NETWORK. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14 , p. 723 – 727, 2006. Disponível em: https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(06)00103-8/fulltext. Acesso em: 09 jan. 2019.

BAXTER, G.M. **Adams & Stashak's lameness in horse**. 6. ed. UK: Ed: Wiley-Blackwell., 1242 p., 2011.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology & Therapeutis**, v. 69, p. 89-95, 2001. Disponível em:

https://ascpt.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1067/mcp.2001.113989. Acesso em: 10 jan. 2019.

BLOM, A. B.; KRAAN, P. M.; BERG, W. B. Cytokine targeting in osteoarthritis. **Current Drug Targets**, v. 8, p. 283-292, 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305506. Acesso em: 13 fev. 2017.

BOLT, D.M. et al. Effects of triamcinolone acetonide, sodium hyaluronate, amikacin sulfate, and mepivacaine hydrochloride, alone and in combination, on morphology and matrix composition of lipopolysaccharide-challenged and unchallenged equine articular cartilage explants. **American Journal of Veterinary Research**. v. 69, p. 861-867, 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593234. Acesso em 14 fev. 2017.

BRAMA, P.A.J.; et al. Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis, and osteochondrosis. **Anais**… Annals of the Rheumatic Diseases, v. 57, p. 697-699, 1998. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1752503/. Acesso em: 13 fev. 2017.

BRAUN, H.J. et al. The effect of local anaesthetics on synoviocytes: a possible indirect mechanism of chondrolysis. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 21, p.1468–1474, 2012.

BREU, A. et al. The cytotoxicity of bupivacaine, ropivacaine, and mepivacaine on human chondrocytes and cartilage. **Anesthesia & Analgesia**, v. 117, p. 514-522, 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749443. Acesso em: 13 fev. 2017.

CAMPEBELL, R. C. et al. Effects of lidocaine on lipopolysaccharide-induced synovitis in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 281-291, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352004000300001. Acesso em: 13 fev. 2017.

CHU, C.R. et al. *In vitro* exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. Arthroscopy: **The Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 22, n 7, p. 693-699, 2006.

CLEGG, P. D. et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. **Equine Veterinary Jornal**, v. 29, p. 343-348, 1997. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com.sci-hub.cc/doi/10.1111/j.2042-3306.1997.tb03137.x/pdf. Acesso em: 06 fev. de 2017.

CLUTTERBUCK, A.L. et al. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **The Veterinary Journal**, v. 183, p. 27–38, 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022687. Acesso em: 11 fev. 2017.

DAHLBERG et al. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type ii collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, p. 673–682, 2000. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131(200003)43:3%3C673::AID-ANR25%3E3.0.CO;2-8/pdf. Acesso em: 11 fev. 2017.

DAVID, F. et al. Cytokine and chemokine gene expression of il-1β stimulated equine articular chondrocytes. **Veterinary Surgery**, v. 36, p. 221–227, 2007.

DYKGRAAF, S. et al. 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. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1532-950X.2007.00235.x . Acesso em: 18 julh. 2018.

DRAGOO, J.L et al. The effect of local anesthetics administered via pain pump on chondrocyte viability. **American Journal Sports Medicine**, 36, p.1484–1488, 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18658020. Acesso em: 13 fev. 2017.

DOGAN N. et al. The effects of bupivacaine and neostigmine on articular cartilage and synovium in the rabbit knee joint. **The Journal of international medical research,** v. 32, p. 513–519, 2004. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/147323000403200509. Acesso em: 14 fev. 2019.

DYSON, P.K. et al. Days lost from training by two- and three-year-old Thoroughbred horses: A survey of seven UK training yards. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, p. 650-657, 2008. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2746/042516408X363242/pdf. Acesso em: 16 fev. 2017.

FIRESTEIN, G.S.; ALVARO-GRACIA, J.M.; MAKI, R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 144, p. 3347-3353, 1990. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2109776. Acesso em: 13 fev. 2017.

FRISBIE, D.D.; McILWRAITH, C.W.; GRAUW, J.C. Synovial Fluid and Serum Biomarkers. In: _____ **Joint Disease in the Horse**. Philadelphia: Saunders, p. 33–48, 2016. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455759699000103. Acesso em: 27 dez. 2018.

FRISBIE, D.D. et al. Treatment of experimental equine osteoarthritis by *in vivo* delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. **Gene Therapy**, v. 9, p.12–20, 2002. Disponível em: https://www.nature.com/articles/3301608. Acesso em 27 dez. 2018.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Matriz extracellular. In: _____ **Tratado de histologia em Cores**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 456p.

GUERNE, P.A.; CARSON, D.A.; LOTZ, M. Il-6 production by human articular chondrocytes modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. **The Journal of Immunology**, v. 144, p.499-505, 1990.

HALL, A.C. et al. Equine articular cartilage chondrocytes: opening the black box. **Equine Veterinary Journal**, v.35, p. 425-428, 2003. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875317. Acesso em: 13 fev. 2017.

HENDERSON, B.; PETTIPHER, E.R. The synovial lining cell: biology and pathobiology. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 15, p. 1-32, 1985. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2994231. Acesso em: 13 fev. 2017.

HUNT, R. J. Clinical evaluation and diagnosis of palmar foot pain. **Anais**… Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Antonio, TX, USA, 2006, 52, 198-202. Disponível em: http:// www.ivis.org/proceedings/aaep/2006/hunt/chapter.asp?LA=1. Acesso em: 16 fev. 2017.

HUNTER, W. **Of the structure and diseases or articulating cartilages**. Phil. Trans. R Soc. London, v. 9, p 514-521, 1743. Disponível em: http://rstl.royalsocietypublishing.org/content/42/462-471/514.full.pdf+html. Acesso em: 13 fev. 2017.

JEFFCOTT, L.B. et al. An assessment of wastage in Thoroughbred racing from conception to 4 years of age. **Equine Veterinary Journal**, v. 14, p. 185-198, 1982. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.1982.tb02389.x/abstract. Acesso em: 14 fev. 2017.

KAMM, J.L.; NIXON, A.J.; WITTE, T.H. Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpie. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 693-699, 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4183755/. Acesso em: 13 fev. 2017.

KUSHNER, I.; SOMERVILLE, J.A. Permeability of human synovial membrane to plasma proteins. Relationship to molecular size and inflammation. **Arthritis and Rheumatology**, v. 14, p. 560-570, 1971. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/art.1780140503?sid=nlm%3Apubmed. Acesso em: 14 fev. 2019.

LEGENDRE, F.; et al. JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 2903-2912, 2003. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419823. Acesso em: 17 fev. 2017.

LETTRY, V. et al. Coculture of equine mesenchymal stem cells and mature equine articular chondrocytes results in improved chondrogenic differentiation of the stem cells. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 58(1), p. 5-15, 2010.

LINDNER, A.; DINGERKUS, A. Incidence of training failure among Thoroughbred horses at Cologne, Germany. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 16, p.85-94, 1993. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167587793900788. Acesso em 16 fev 2017.

MANCINI, F. et al. Effects of xylazine and dexmedetomidine on equine articular chondrocytes in vitro. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.44, p. 295-308, 2017.

MARTIN, G.S.; MCILWRAITH, C.W. Effect of intra-articular injection of ontosein and saline solution on equine synovia. **Equine Veterinary Science**, v. 6, p. 120-123, 1986. Disponível em: https://www.j-evs.com/article/S0737-0806(86)80060-0/fulltext. Acesso em: 17 jul. 2018.

McCULLOCH, R.S. et al.. Identification of stable normalization genes for quantitative real-time PCR in porcine articular cartilage. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 3, p. 1-7, 2012.

McILWRAITH, C. W.; WRIGHT, I. NIXON, A.J. **Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse**. Ed: Mosby, 4th edition, 464p., 2014.

McILWRAITH, C.W. Traumatic Arthritis and Posttraumatic Osteoarthritis in the Horse. In: _____ **Joint Disease in the Horse**. Philadelphia: Saunders, p. 33–48, 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455759699000036. Acesso em: 27 dez. 2018.

McILWRAITH, C.W. et al. Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, p. 823-831, 2018. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jor.23738. Acesso em: 10 jan. 2019.

NICHOLSON, A.M. et al. Associations of horse age, joint type, and osteochondral injury with serum and synovial fluid concentrations of type II collagen biomarkers in Thoroughbreds. **American Journal of Veterinary Research**, v.71, p. 741-749, 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594075. Acesso em: 13 fev. 2017.

NICKEL, R. et al. The anatomy of the domestic animals, v.1, **The locomotor system of the domestic animals**. New York, Springer-Verlag, p.170, 1986.

PABLOS ALVAREZ, J. L. La interleucina en la fisiopatologia de la artritis reumatoide. **Reumatología Clínica**, v. 5, n. 1, p. 34-39, 2009. Disponível em: http://www.reumatologiaclinica.org/es/la-interleucina-6-fisiopatologia-artrirtis/articulo/S1699258X09702037/. Acesso em: 13 fev. 2017

PARK, J. et al. Comparison of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine in equine articular chondrocytes. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, 38, p.127–133, 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21303444. Acesso em: 13 fev. 2017.

PLATT, D. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. In: _____ **Joint disease in the horse**. Pennsylvania, W.B Saunders Company, Cap.2, 490p, p.29-40, 1996.

PLEASANT, R.S. et al. Intra-articular anesthesia of the distal interphalangeal joint alleviates lameness associated with the navicular bursa in horses. **Veterinary Surgery**, v.26, n.2, p.137-140. 1997. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9068164 . Acesso em: 16 fev. 2017.

PIPER, S.L.; KIM, H.T. Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 90, p. 96-991, 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451389. Acesso em: 13 fev. 2017.

PIAT, P. et al. *In vivo* effects of a single intra-articular injection of 2% lidocaine or 0.5% bupivacaine on articular cartilage of normal horses. **Veterinary Surgery**, v.41, p.1002–1010, 2012. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1532-950X.2012.01039.x/abstract. Acesso em: 13 fev. 2017.

POMBO-SUAREZ, M. et al. Practical normalization of mRNA expression in quantitative PCR for cartilage research. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17(6), p. 818–819, 2009.

POZZOBON, R. et al. Características físico-químicas e citológicas do líquido sinovial de pôneis com modelo de sinovite induzida. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 1303-1309, 2009. Disponível em: https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/4491. Acesso em: 17 jul. 2018.

ROCHA JUNIOR, S.S. et al. Avaliações macroscópica e histológica do reparo da cartilagem articular equina tratada com microperfurações do osso subcondral associadas ou não à injeção intraarticular de cartogenina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p.272-278, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2016000400272&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em 13 fev. 2017.

ROSSDALE, P.D. et al. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. **Veterinary Records**, v. 116, p.66-9, 1985. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3976145. Acesso em: 11 fev. 2017.

RUBIO-MARTÍNEZ, L.M. et al. Local anaesthetics or their combination with morphine and/or magnesium sulfate are toxic for equine chondrocytes and synoviocytes *in vitro*. **BMC Veterinary Research**, v. 13, p. 1-8, 2017.

RUNGSRI, P.K., et al. Use of body-mounted inertial sensors to objectively evaluate the response to perineural analgesia of the distal limb and intra-articular analgesia of the distal interphalangeal joint in horses with forelimb lameness. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, n.8, p.972-977. 2014. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080614001695. Acesso em: 16 fev. 2017.

SÁNCHEZ-RAMÓN, S.; LÓPEZ-LONGO, F. J.; CARREÑO, L. Interleucinas em la fisiopatologia de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. **Reumatología Clínica**, V. 6, n. 3, p. 20-24, 2011. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1699258X11000222. Acesso em: 14 fev. 2017

SANTOS, L.C.P., MORAES, A.N., SAITO, M.E. Effects of intraarticular ropivacaine and morphine on lipopolysaccharide-induced synovitis in horses. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, 36, p.280–286, 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19397780. Acesso em: 13 fev. 2017.

SCHAEFER, E.C. et al. Effects of sodium hyaluronate and triamcinolone acetonide on glucosaminoglycan metabolism in equine articular chondrocytes treated with interleukin-1. American Journal of Veterinary Research, v.70, p. 1494-1501, 2009.

SCHRAMME M. et al. Diagnostic analgesia of the foot: techniques & interpretations. **Anais**… Proceedings of the Belgian Equine Practitioners Society, Leuven, Belgium, 2015, 9-19.

a SCHUMACHER J. et al. A comparasion of the effects of local analgesic solution in the navicular bursa of horses with lameness caused by solar toe or solar heel pain. **Equine Veterinary Journal**, v.33, n.4, p.386-389. 2001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469772. Acesso em: 16 fev. 2017.

b SCHUMACHER J. et al. A comparison of the effects of two volumes of local anesthetic solution in the distal interphalangeal joint of horses with lameness caused by solar heel pain. **Equine Veterinary Journal**, v.33, n.3, p.265-268. 2001. Disponível em: http://dx.doi.org/10.2746/042516401776249778. Acesso em: 16 fev. 2017.

SCHUMACHER J. et al. The effect of local anaesthetic solution in the navicular bursa of horses with lameness caused by distal interphalangeal joint pain. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.5, p.502-505. 2003. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2746/042516403775600460/abstract. Acesso em: 16 fev. 2017.

SCHUMACHER J. et al. Diagnostic analgesia of the equine digit. **Equine Veterinary Education**, v.25, n.8, p.408-421. 2013. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eve.12001/abstract. Acesso em 16 fev. 2017.

SILVA, G.B. et al. Duration and efficacy of different local anesthetics on the palmar digital nerve block in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, p. 749–755, 2015. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080615004852. Acesso em: 03 fev. 2017.

SONG, R.H. et al. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both adamts-4 and adamts-5. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, p. 575–585, 2007. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.22334/abstract. Acesso em: 11 fev. 2017.

STEEL, C.M. Equine synovial fluid analysis. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 24, p. 437-454, 2008.

STOVER S.M.; POOL, R.R. Effect of intra-articular gentamicin sulfate on normal equine synovial membrane. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p. 2485-2491, 1985.

STEWART, M.C. et al. Phenotypic Stability of Articular Chondrocytes *In Vitro*: The Effects of Culture Models, Bone Morphogenetic Protein 2, and Serum Supplementation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.15, p.166–174, 2000. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1359/jbmr.2000.15.1.166. Acesso em: 12 dez. 2018.

STOVER, S.M. The epidemiology of thoroughbred racehorse injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 2, p.312-322, 2003. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534751604000083. Acesso em: 11 fev. 2017.

TIZARD, I. R. Citocinas e sistema imune. In: _____ **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6ª ed. São Paulo. Roca. 2002. 532p.

TOEGEL, S. et al. Selection of reliable reference genes for qPCR studies on chondroprotective action. **BMC Molecular Biology**, v.8:13, p. 1-10, 2007.

VAN WEEREN, P.R. General anatomy and physiology of joint. In: _____ **Joint Disease in the Horse**. Philadelphia: Saunders, p.1-24, 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455759699000012.
Acesso em: 27 dez. 2018.

TODHUNTER, R.J. General principles of joint pathobiology. In: _____ **Joint disease in the horse**. Pennsylvania, W.B Saunders Company, Cap.1, 490p, p.1-28, 1996.

TURNER, A. T. Predictive value of diagnosis tests for navicular paim. **Anais**… Proceedings of 42nd annual convention of AAEP, Denver, Colorado, vol.42, 201-204. 1996.

TULAMO, R.M.; BRAMLAGE, L.R.; GABEL, A.A. Sequential clinical and synovial fluid changes associated with acute infectious arthritis in the horse. **Equine Veterinary Journal**. v. 21, p. 325-31, 1989. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2042-3306.1989.tb02681.x?sid=nlm%3Apubmed. Acesso em: 05 jul. 2018.

United States Department of Agriculture - USDA. **Lameness and Laminitis in US Horses**. Fort Colins, 2000. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/equine/downloads/equine98/Equine98_dr_Lameness.pdf>. Acesso em 15 jan. 2015

VAN BEUNINGEN, H.K. et al. *In vivo* protection against interleukin- 1-induced articular cartilage damage by transforming growth factor-13: age-related differences. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 53, p. 593-600, 1994. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1005411/pdf/annrheumd00497-0041.pdf. Acesso em: 11 fev. 2017.

ZHANG, Z. et al. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. **Journal of Anatomy**, v. 205, p. 229–237, 2004. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1571343/ . Acesso em: 12 dez 2018. doi:10.1111/j.0021-8782.2004.00327.x

WAGNER, A.E.; MCILWRAITH, C.W.; MARTIN, G.S. Effect of intra-articular injection of orgotein and saline solution on equine synovia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 594-597, 1982.

WHITE, K.K. et al. Changes in equine carpal joint synovial fluid in response to the injection of two local anesthetic agents. **Cornell Veterinary** v. 79, p. 25-38, 1989. Disponível em; https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=coo.31924056935665;view=1up;seq=44. Acesso em 19 jul. 2018.

YAO, W. et al. Ropivacaine relieves pain and prevents chondrocyte degradation probably through Calcineurin/NFAT1 signaling pathway in osteoarthritis rats. **European Journal of Pharmacology**, v.818, p. 518–524, 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001429991730763X?via%3Dihub. Acesso em: 20 jan. 2019.

YUNG LEE, J. et al. New use of a three-dimensional pellet culture system for human intervertebral disc cells: initial characterization and potential use for tissue engineering. **Spine**, v.26, p. 2316-22, 2001. Disponível em: https://journals.lww.com/spinejournal/Fulltext/2001/11010/New_Use_of_a_Three_Dimensional_Pellet_Culture.5.aspx. Acesso em: 12 dez. 2018.