

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA



Estudo da influência do exercício, da idade e da presença de lesões de osteocondrose nos níveis séricos de biomarcadores ósseos no cavalo Lusitano linha Alter Real.

Nuno Filipe Gomes Bernardes

CONSTITUIÇÃO DO JURÍ

Professor Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís
Professor Doutor António José Almeida Ferreira
Professora Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias
Professor Doutor Mário Manuel Dinis Ginja
Professora Doutora Teresa de Jesus da Silva Matos

ORIENTADOR

Professora Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Co-ORIENTADOR

Professor Doutor António José Almeida Ferreira

2008
LISBOA

Ao meu filho ...
... e aos que aí vêm!!

RESUMO

O presente estudo pretendeu avaliar a influência do exercício, da idade e da presença de lesões de osteocondrose (OC) nos níveis séricos de biomarcadores ósseos em cavalos de raça Lusitana, em particular numa população de garanhões Alter Real.

Os biomarcadores ósseos constituem uma forma expedita e não invasiva de avaliar e monitorizar o metabolismo ósseo em várias espécies animais incluindo os cavalos. Alguns destes biomarcadores ósseos traduzem a actividade de deposição e formação de osso enquanto outros traduzem a actividade reabsorptiva neste mesmo tecido.

Uma população de 50 garanhões de raça Lusitana, linha Alter Real, foi sujeita a um exame radiográfico sumário das articulações metacarpo- e metatarsofalângicas e também das articulações de ambos os tarsos para pesquisa de lesões de osteocondrose. A esses cavalos foi também recolhido sangue para poder avaliar os níveis séricos de biomarcadores de deposição/formação óssea, osteocalcina, fosfatase alcalina de especificidade óssea (FAO) e propeptídeo aminoterminal de procologénio tipo-I (PINP), e de reabsorção óssea, telopeptídeo carboxiterminal de colagénio tipo-I (ICTP). Esta avaliação permitiu estudar diferentes grupos tendo em conta a presença ou a ausência de lesões de osteocondrose (grupo controlo – ausência de lesões vs. grupo OC – presença de lesões), a idade dos cavalos (grupo A - < 10 anos vs. grupo B - > 10 anos) e o regime de trabalho a que estavam sujeitos (grupo D – regime menos intenso vs. grupo T – regime mais intenso). Os procedimentos foram realizados num único momento no tempo não tendo sido sujeitos a reavaliações subsequentes.

Os resultados encontrados permitiram verificar diferenças significativas ($P < 0,05$) nos animais sujeitos ao regime de exercício mais intenso que apresentavam valores mais elevados de FAO quando comparados com os cavalos sujeitos ao regime menos intenso. Já na comparação entre grupos etários foi o ICTP que apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) revelando valores mais elevados nos animais mais jovens. Nestes mesmos grupos também a osteocalcina revelou uma tendência ($P = 0,08$) para apresentar valores mais baixos nos animais mais velhos. No que respeita à presença ou ausência de lesões de OC, e apesar de não se terem encontrado diferenças significativas nos níveis dos biomarcadores ósseos entre os grupos, importa referir que se observaram valores de prevalência total de cavalos afectados de 16% ($n=8$), sendo que 6% das lesões afectavam o tarso e 12% os

boletos. Esta aparente incongruência de valores deve-se à existência de lesões tanto nos tarsos como nos boletos em pelo menos um cavalo. Este valor enquadra-se totalmente nas referências da literatura.

Através deste trabalho é pois possível confirmar a utilidade dos biomarcadores ósseos na avaliação do metabolismo ósseo de cavalos em diferentes situações e sob influências variadas, sendo no entanto necessário realizar mais estudos para poder conhecer melhor a relação entre os factores implicados nas alterações metabólicas e a sua tradução em termos bioquímicos.

ABSTRACT

This study main objective was to evaluate the influence of exercise, age and presence of osteochondrosis (OC) lesions on the serum levels of bone markers in Lusitano horses, particularly in a Alter Real stallion population.

Bone markers are a very expedite and non invasive procedure to evaluate and monitor bone metabolism in a variety of animal species including horses. Some of these bon markers reflect bone formation and deposition while others reflect bone resorption.

A population of 50 Lusitano stallions, Alter Real, was submitted to a radiographic examination of the metacarpo- and metatarsophalangeal joints and also of both tarsus to search for OC lesions. Venous blood samples were taken from these same horses to evaluate the serum levels of markers indicating bone deposition/formation, osteocalcin, bone specific alkaline phosphatase (BAP) and amino-terminal type-I procollagen propeptide (PINP), and indicating bone resorption, carboxy-terminal telopeptide of type-I collagen (ICTP). This evaluation allowed the study of different groups concerning the presence or absence of OC lesions (control group – absence of lesions vs. OC group – presence of lesions), the age of the horses (group A - < 10 years old vs. group B - > 10 years old) and the exercise program they were submitted to (group D – low intensity exercise program vs. group T – high intensity exercise program). Those procedures were performed at the same time in all animals and in only one evaluation, without any other further revaluations.

The results revealed significant differences between horses submitted to different exercise programs ($P < 0,05$) with those in the high intensity exercise program showing higher BAP levels compared with those in the low intensity group. Comparing age groups it was the ICTP that revealed significant differences ($P < 0,05$) with the younger animals presenting the higher values. In these same age groups, osteocalcin presented a tendency to decrease ($P = 0,08$) in older animals. Regarding the presence of OC lesions, and although there were no significant differences on the serum levels of any bone marker among all the study groups, it must be referred the prevalence values found in this sample showing 16% ($n = 8$) of affected horses, with a total of 6% of lesions in the tarsus and 12% in the fetlocks. This apparent inconsistency is explained by the fact that at least one of the horses presenting OC lesions had both the tarsus and the fetlocks affected. These figures are consistent with the references presented in the reviewed literature.

From this work it is possible to confirm the usefulness of bone markers in the evaluation of bone metabolism in horses in different situations and under varied influences. It is still necessary to perform more studies in order to understand the relationship between the factors implied in the metabolic changes and their biochemical reflex.

AGRADECIMENTOS

Ainda que temendo deixar de fora alguém cujo contributo para este trabalho tenha sido inestimável não seria possível desperdiçar esta oportunidade de agradecer a todos quantos o tornaram realmente possível:

À Professora Doutora Graça Ferreira-Dias pela orientação, pela simpatia, pelo empenho e pela experiência transmitida durante todo o trabalho bem como pela paciência generosa sempre demonstrada;

Ao Professor Doutor António Ferreira pela aceitação da co-orientação deste trabalho numa área que também lhe é querida nas insondáveis profundezas da radiologia clínica e cuja experiência foi fundamental, bem como pela amizade sempre demonstrada;

Ao Dr. Filipe Graciosa pela sua disponibilidade e colaboração na utilização dos cavalos da EPAE durante o estudo;

Ao José Veiga, à Bárbara Gericota, à Filipa Joglar e a todos os alunos que colaboraram na árdua tarefa de realizar os exames radiográficos a todos os cavalos da EPAE;

Ao Sr. Zé, ao Nuno, ao Luís e demais tratadores da EPAE pela colaboração e bom ambiente criado durante a realização dos exames radiográficos;

À Piclusa, na pessoa do Sr. Francisco Esteves, pela indispensável e “arriscada” cedência do gerador portátil de raios-X para a realização dos exames radiográficos;

À Faculdade de Medicina Veterinária por me ter facilitado as condições para a realização deste mestrado bem como por me ter feito sentir em casa por forma a poder usufruir de toda a logística e todas as infra-estruturas necessárias;

À Professora Doutora Luísa Mateus e ao Professor Doutor Robalo Silva pelo apoio na realização dos ensaios laboratoriais bem como pela experiência e conhecimentos imprescindíveis à realização dos mesmos;

Ao Professor Doutor Rui Caldeira pela paciência e por acreditar que era possível chegar a bom porto;

À Doutora Paula Serrão pela ajuda na preparação das amostras;

À Catarina, ao André, à Maria, e a todos quantos foram insistindo e perseverando na pressão positiva para o finalizar do trabalho, colegas de trabalho, professores, familiares, amigos e até mesmo alunos da F.M.V.

Aos meus sogros pelo apoio no *baby-sitting* e na cedência do “ermitério” em alturas que necessitaram de maior reclusão;

Aos meus pais e irmãos por estarem sempre comigo, não em presença, mas sempre em espírito;

À minha mulher pelo apoio e pela paciência revelada em todo este longo caminho e por estar sempre a meu lado mesmo nos períodos de maior desmotivação;

Ao meu filho Duarte, “projecto” que veio assumir preponderância na minha vida e que, mesmo roubando-me muito do tempo necessário à conclusão deste trabalho, acabou por ser a minha maior motivação.

A todos o meu muito, muito obrigado!

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|-------------|
| RESUMO | I |
| ABSTRACT | III |
| AGRADECIMENTOS | V |
| ÍNDICE GERAL | VII |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS | IX |
| ÍNDICE DE TABELAS | XII |
| SÍMBOLOS E ABREVIATURAS UTILIZADOS | XIII |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJECTIVOS | 4 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 3.1 EMBRIOLOGIA E FISIOLOGIA DO COMPLEXO OSTEOARTICULAR | 6 |
| 3.2 OSSIFICAÇÃO ENDOCONDAL | 7 |
| 3.3 O MECANISMO DE REMODELAÇÃO ÓSSEA | 8 |
| 3.4 IMPACTO DOS PROBLEMAS OSTEOARTICULARES NA CADEIA DE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE CAVALOS | 10 |
| 3.5 PRINCIPAIS MANIFESTAÇÕES PATOLÓGICAS DOS DISTÚRBIOS OSTEOARTICULARES EM CAVALOS | 11 |
| 3.5.1 OSTEOARTRITE | 12 |
| 3.5.2 OSTEOCONDROSE | 13 |
| 3.6 IMPACTO DO EXERCÍCIO NO PROCESSO DE REMODELAÇÃO ÓSSEA E NA PATOGENIA DA OSTEOCONDROSE | 18 |
| 3.7 OUTRAS VARIÁVEIS IMPORTANTES NO PROCESSO DE REMODELAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ÓSSEO E NA PATOGENIA DA OSTEOCONDROSE | 21 |
| 3.7.1 ALIMENTAÇÃO | 21 |
| 3.7.2 HEREDITARIEDADE | 25 |
| 3.7.3 CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS | 28 |
| 3.7.4 IDADE | 28 |
| 3.8 MÉTODOS DE MONITORIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE DISTÚRBIOS OSTEOARTICULARES, EM PARTICULAR A OSTEOCONDROSE | 29 |
| 3.8.1 MÉTODOS IMAGIOLÓGICOS | 30 |
| 3.8.1.1 Radiologia convencional | 30 |
| 3.8.1.2 Cintigrafia | 30 |
| 3.8.1.3 Tomografia Computadorizada (TC) e Ressonância Magnética (RM) | 31 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.8.1.3.1 | <i>Tomografia Computadorizada</i> | 32 |
| 3.8.1.3.2 | <i>Ressonância Magnética</i> | 32 |
| 3.8.2 | MÉTODOS BIOQUÍMICOS | 33 |
| 3.8.2.1 | Avaliação de biomarcadores do metabolismo ósseo | 33 |
| 3.8.2.2 | Biomarcadores de Formação Óssea | 36 |
| 3.8.2.2.1 | <i>Osteocalcina</i> | 36 |
| 3.8.2.2.2 | <i>Fosfatase Alcalina de Especificidade Óssea (FAO)</i> | 38 |
| 3.8.2.2.3 | <i>Propeptídeo Carboxiterminal de Procolagénio Tipo I (PICP)</i> | 39 |
| 3.8.2.2.4 | <i>Propeptídeo Aminoterminal de Procolagénio Tipo I (PINP)</i> | 41 |
| 3.8.2.3 | Biomarcadores de Reabsorção Óssea | 41 |
| 3.8.2.3.1 | <i>Telopectídeo Carboxiterminal de Colagénio Tipo I (ICTP)</i> | 41 |
| 4 | <u>MATERIAL E MÉTODOS</u> | 45 |
| 4.1 | CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO | 45 |
| 4.2 | MANEIO GERAL DA POPULAÇÃO DURANTE O ESTUDO | 45 |
| 4.2.1 | ALIMENTAÇÃO | 45 |
| 4.2.2 | REGIME DE EXERCÍCIO FÍSICO | 46 |
| 4.3 | AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA | 47 |
| 4.4 | RECOLHA DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS | 48 |
| 4.5 | AVALIAÇÃO LABORATORIAL DOS BIOMARCADORES ÓSSEOS | 49 |
| 4.5.1.1 | Osteocalcina | 49 |
| 4.5.1.2 | Fosfatase Alcalina de Especificidade Óssea (FAO) | 50 |
| 4.5.1.3 | Propeptídeo Aminoterminal de Procolagénio Tipo-I (PINP) | 51 |
| 4.5.1.4 | Telopectídeo Carboxiterminal de Colagénio Tipo-I (ICTP) | 51 |
| 4.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS | 51 |
| 5 | <u>APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</u> | 53 |
| 5.1 | AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA | 53 |
| 5.2 | AVALIAÇÃO LABORATORIAL DOS BIOMARCADORES ÓSSEOS | 57 |
| 6 | <u>CONCLUSÃO</u> | 66 |
| 7 | <u>BIBLIOGRAFIA</u> | 68 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 – Distribuição percentual dos cavalos que apresentaram lesões de OC no conjunto da população em estudo (n=50) | 53 |
| Gráfico 2 – Valores séricos de ICTP nos grupos Controlo e Lesões OC | 57 |
| Gráfico 3 – Valores séricos médios de PINP nos grupos Controlo e Lesões OC | 58 |
| Gráfico 4 – Valores séricos médios de Osteocalcina nos grupos Controlo e Lesões OC | 58 |
| Gráfico 5 – Valores séricos médios de FAO nos grupos Controlo e Lesões OC | 59 |
| Gráfico 6 – Valores séricos médios de ICTP nos grupos D (trabalho menos intenso) e T (trabalho mais intenso) | 60 |
| Gráfico 7 – Valores séricos médios de PINP nos grupos D (trabalho menos intenso) e T (trabalho mais intenso) | 61 |
| Gráfico 8 – Valores séricos médios de Osteocalcina nos grupos D (trabalho menos intenso) e T (trabalho mais intenso) | 61 |
| Gráfico 9 – Valores séricos médios de FAO nos grupos D (trabalho menos intenso) e T (trabalho mais intenso) | 62 |
| Gráfico 10 – Valores séricos médios de ICTP nos grupos A (idade<10 anos) e B (idade>10 anos) | 63 |
| Gráfico 11 – Valores séricos médios de ICTP nos grupos A (idade<10 anos) e B (idade>10 anos) | 63 |
| Gráfico 12 – Valores séricos médios de Osteocalcina nos grupos A (idade<10 anos) e B (idade>10 anos) | 64 |

Gráfico 13 – Valores séricos médios de FAO nos grupos A (idade<10 anos) e B (idade>10 anos) 64

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Lesões de OC identificadas nos tarsos | 55 |
| Figura 2 – Lesões de OC identificadas nos tarsos | 56 |
| Figura 3 – Lesões de OC identificadas nos boletos | 56 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Composição do alimento concentrado comercial fornecido aos animais da população em estudo | 46 |
| Tabela 2 – Distribuição dos animais pelos diferentes grupos etários e pelos diferentes grupos de exercício (Grupo T – 45 minutos exercício; Grupo D – 30 minutos exercício) | 47 |
| Tabela 3 – Dados de reactividade cruzada para testes comerciais de avaliação sérica de biomarcadores de formação óssea (Adaptado de Allen, 2003) | 50 |
| Tabela 4 – Dados de reactividade cruzada para testes comerciais de avaliação sérica e urinária de biomarcadores de reabsorção óssea (Adaptado de Allen, 2003)..... | 50 |
| Tabela 5 – Interacções estatisticamente significativas dos valores de ICTP obtidos durante o estudo | 65 |
| Tabela 6 – Interacções estatisticamente significativas dos valores de osteocalcina obtidos durante o estudo | 65 |

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS UTILIZADOS

CdLCrMO – Caudolateral-Craniomedial Oblíqua

cm - centímetro

CTx – carboxi-telopeptídeo de colagénio tipo I

D – Exercício menos intenso

DMPILO – Dorsomedial-Plantarolateral Oblíqua

DPI – Dorsoplantar

dt^a - Direita

EIA – *Enzyme Immunoassay*

esq – Esquerda

ICTP – Telopectídeo carboxiterminal de colagénio tipo I

IGF-I – *Insulin-like growth factor I*

IGF-II – *Insulin-like growth factor II*

IgG – Imunoglobulina G

INTP – Telopectídeo aminoterminal de colagénio tipo I

ITD – Intertársica distal (articulação)

ITP – Intertársica proximal (articulação)

Kv – Kilovoltagem

KWPN – *Royal Dutch Warmblood Studbook*

LM – Lateromedial

LSD – *Least significant differences*

mA - miliamperagem

McIIPI – Metacarpofalângica (articulação)

NRC – *National Research Council (Committee on Animal Nutrition)*

OA – Osteoartrite

OC – Osteocondrose

OCD – Osteocondrite Dissecante

PICP – Propeptídeo carboxiterminal de procolagénio tipo I

PINP – Propeptídeo aminoterminal de procolagénio tipo I

pNPP – p-nitrofenilfosfato

ppm – partes por milhão

RIA – *Radioimmunoassay*

RM – Ressonância magnética

T – Exercício mais intenso

T3 – Triiodotironina

T4 – Tiroxina

TC – Tomografia computadorizada

TCr – Tarsocrural (articulação)

TD-Pyr – Deoxipiridinolina total

TMtIII – Tarsometatársica (articulação)

VEGF – Factor de crescimento vascular endotelial

1 INTRODUÇÃO

O sistema musculoesquelético dos cavalos é porventura o sistema orgânico mais importante no que respeita à sua utilização desportiva. É sem dúvida o sistema que mais vezes está associado a problemas que podem condicionar definitivamente a utilização destes animais e o conseqüente rendimento, geralmente desportivo, que deles seria esperado. Segundo Rosedale *et al.* (1985), os distúrbios com sede osteoarticular são uma das principais causas de reforma da competição em cavalos de desporto. A etiologia destes problemas é muito variada sendo condicionada por aspectos tão diversos como a alimentação, o nível de exercício, a genética, a conformação e aprumos, entre outros (Hurtig, 1996).

Procurando fazer uma análise generalizada da importância destes distúrbios, é possível verificar que estes se traduzem num maior ou menor grau de incapacidade desportiva causada por um fenómeno doloroso associado a processos de osteoartrite. A osteoartrite (OA), enquanto fenómeno de características inflamatórias com sede osteoarticular, traduz clinicamente um desequilíbrio da homeostasia deste mesmo complexo osteoarticular. Este desequilíbrio, mais ou menos precoce, pode no entanto vir a traduzir-se num processo degenerativo que, de uma maneira geral, assume maior relevância em animais mais velhos. É no entanto frequente verificar-se a existência de animais muito jovens com problemas osteoarticulares do género osteoartrítico em consequência de fenómenos patológicos de origem muito precoce. Neste particular é possível encontrarem-se formas de OA juvenil apresentando alterações crónicas irreversíveis cujas consequências são geralmente de carácter permanente. É sobretudo na avaliação do impacto destas patologias osteoarticulares que a abordagem epidemiológica a estes problemas tem o seu maior interesse em produção animal.

Contudo, não se pretendeu neste trabalho abordar a generalidade dos processos osteoartríticos existentes nos cavalos. Nesta perspectiva procurou-se seleccionar uma entidade patológica com tradução osteoarticular cuja relevância em termos de produção animal fosse amplamente reconhecida. Optou-se então por abordar a Osteocondrose (OC) que é genericamente englobada no chamado grupo das Doenças Ortopédicas do Desenvolvimento (DOD) e cujas características clínicas estão também bastante bem definidas.

A OC é uma entidade patológica característica do processo de desenvolvimento musculoesquelético que traduz um distúrbio do processo de ossificação endocondral e cuja etiologia não está ainda bem esclarecida (Billinghurst *et al.*, 2004; van Weeren, 2005). A multifactorialidade associada à etiologia da OC e as suas consequências no desenvolvimento osteoarticular dos cavalos são há muito objecto dos mais variados estudos. O principal objectivo das investigações nesta área tem sido o de tentar reduzir ao máximo a incidência de OC nas populações equinas e minimizar os efeitos nefastos que lhe estão associados, quer em termos individuais quer em termos das diferentes populações animais.

Várias associações de criadores de cavalos em todo o mundo têm vindo a realizar processos de selecção animal com o intuito de eliminar da cadeia reprodutiva animais com OC confirmada. Deste modo tem sido possível reduzir drasticamente os níveis de incidência de OC em algumas populações de cavalos (van Weeren, 2005), contribuindo assim decisivamente para um maior sucesso nas opções da produção, com as consequentes mais valias em termos qualitativos e económicos.

Relativamente ao cavalo Puro Sangue Lusitano não existem dados que permitam avaliar o actual estado da sua população, em particular dos reprodutores inscritos no livro genealógico da raça. Nesse sentido, a importância do desenvolvimento de um trabalho que, ainda que de modo sumário e limitado pudesse caracterizar uma amostra de animais de raça Lusitana quanto à incidência de lesões de OC, teria toda a pertinência em termos de produção animal. É para a cadeia produtiva que estas informações são de facto importantes, podendo assim constituir uma importante base de dados que fundamente o processo de selecção, que se pretende informado e consciente de modo a traduzir na prática os resultados pretendidos.

Outro dos aspectos que se pretendeu caracterizar neste trabalho foi a existência de uma possível relação entre os elementos condicionadores do estado do sistema musculoesquelético num dado momento (nível de exercício, idade, evidência de OC) e a sua tradução bioquímica no metabolismo ósseo avaliada através dos níveis séricos de alguns biomarcadores ósseos. Procurou-se avaliar a influência destes factores e simultaneamente caracterizar possíveis mecanismos de diagnóstico precoce de situações de OC, por forma a poder de algum modo prevenir a sua ocorrência e atenuar o seu desenvolvimento.

Ao longo de várias décadas, muitos têm sido os métodos de diagnóstico investigados com este propósito. Os principais aspectos nos quais mais se têm centrado estas investigações são relativos à precocidade de cada método na identificação de processos de OC em desenvolvimento e à aplicabilidade prática destes mesmos métodos.

Outros aspectos relevantes e desejáveis para estes métodos é que possam ser rápidos, precoces, relativamente baratos e pouco invasivos (Lepage *et al.*, 2001; Carstanjen *et al.*, 2004). Neste contexto, a avaliação dos níveis séricos de biomarcadores do metabolismo ósseo tem vindo a ser alvo de muitos e interessantes estudos (Dik *et al.*, 1999; Lepage *et al.*, 2001; Billinghamurst *et al.*, 2004; Carstanjen *et al.*, 2004). Estes estudos têm procurado avaliar os mecanismos de formação e reabsorção óssea através da medição de biomarcadores específicos tais como a osteocalcina e a fosfatase alcalina de especificidade óssea, ou ainda alguns precursores ou subprodutos do metabolismo colagénico como os peptídeos amino- e carboxiterminais de procologénio tipo I ou os telopeptídeos amino- ou carboxiterminais de colagénio tipo I, entre outros.

Em alguns trabalhos foi já possível estabelecer algumas relações entre o desenvolvimento da OC e a presença de alterações dos valores séricos de alguns desses biomarcadores do metabolismo ósseo (Lepage *et al.*, 1990; Price *et al.*, 1995a e 1995b; Billinghamurst *et al.*, 2004). Há no entanto que considerar que o estado do metabolismo ósseo é condicionado por muitos outros factores de capital importância entre os quais é possível destacar a alimentação, a idade dos animais e o nível de exercício físico a que estão sujeitos.

O grande interesse e objectivo das pesquisas realizadas nesta área é a possibilidade de conduzir estudos multidisciplinares, consistentes com práticas científicas modernas, que possam produzir informação prática para os criadores de cavalos (van Weeren e Barneveld, 1999).

2 OBJECTIVOS

O objectivo central deste estudo foi avaliar os efeitos de dois regimes de exercício distintos na caracterização bioquímica do metabolismo ósseo de uma população de cavalos de raça Puro Sangue Lusitano, bem como dos efeitos da idade e também da presença de lesões de OC nos níveis destes mesmos marcadores. Selecionando a avaliação de biomarcadores séricos do metabolismo ósseo, em concreto a osteocalcina, a fosfatase alcalina de especificidade óssea (FAO), o propeptídeo aminoterminal de procolagénio tipo I (PINP) e o telopeptídeo carboxiterminal de colagénio tipo I (ICTP), pretendeu-se compreender melhor o metabolismo ósseo no cavalo Lusitano e extrair possíveis ilações práticas da utilização destes marcadores ósseos como auxiliares de diagnóstico precoce de patologias osteoarticulares, em particular de OC. A análise da influência do exercício sobre a tradução bioquímica do metabolismo ósseo pode também fornecer informações importantes para o estabelecimento de programas de condicionamento atlético durante a preparação desportiva dos cavalos, além de permitir a constante monitorização dos mesmos.

No momento em que se iniciou este trabalho não havia na literatura científica, ao contrário do que foi possível verificar para outras raças ou grupos de raças, quaisquer dados que permitissem caracterizar a raça Lusitana no que respeita à OC.

No que respeita à avaliação sérica de biomarcadores ósseos, esta tem vindo a ser alvo dos mais variados estudos. Através deles tem-se pretendido determinar a potencialidade destes biomarcadores enquanto meios de diagnóstico não invasivo e precoce de alterações do metabolismo musculoesquelético em diversas espécies animais, incluindo o homem. Além disto, têm contribuído decisivamente na monitorização de programas de tratamento e na evolução de processos patológicos instalados, em particular em casos de osteoporose em humanos (Allen, 2003).

A consubstanciação das observações registadas na literatura acerca da utilidade destes biomarcadores poderá até, num futuro não muito distante, constituir um instrumento extremamente útil na identificação precoce de animais potencialmente em risco.

Ao poder realizar esta avaliação precoce, o produtor poderá desta forma fazer opções muito mais informadas no manejo e na selecção dos seus animais evitando muitas vezes enormes prejuízos associados a estas doenças.

É também importante registar que através destes estudos, e da definição de uma forma mais equilibrada e fundamentada de regimes de exercício físico que maximizem o potencial atlético dos cavalos, se poderão atenuar ou até evitar as consequências nefastas de programas treino e de regimes de condicionamento físico manifestamente inadequados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 EMBRIOLOGIA E FISIOLOGIA DO COMPLEXO OSTEOARTICULAR

O tecido ósseo é um tecido especializado constituído por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), matriz orgânica (colagénio tipo I sobre uma intrincada rede de proteoglicanos), e uma matriz inorgânica mineralizada constituída maioritariamente por fosfato de cálcio sob a forma de cristais de hidroxiapatite. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese de matéria óssea contribuindo para o processo de calcificação através de secreção para a matriz de pequenas vesículas ricas em fosfatase alcalina. Quando aprisionados no interior da matriz calcificada os osteoblastos transformam-se em osteócitos. Quando estes morrem inicia-se o processo de reabsorção da matriz óssea. A reabsorção activa do osso mineralizado e da cartilagem é realizada pelos osteoclastos. Estes segregam enzimas proteolíticas que degradam os componentes orgânicos da matriz óssea (Junqueira e Carneiro, 1995).

Nos mamíferos, a formação dos ossos, em particular dos ossos longos, decorre através de um processo denominado de ossificação endocondral o qual utiliza um modelo cartilágneo que vai assumindo progressivamente as características do osso e das cartilagens articulares (Billinghurst *et al.*, 2004). Este processo é assim denominado, em contraste com a ossificação intramembranosa, pela localização da sua ocorrência. No que respeita ao processo osteogénico em si, este ocorre em ambos os casos através da deposição de sais de cálcio pelos osteoblastos na matriz primordial fibrosa e amorfa (Junqueira e Carneiro, 2005). Logo após o nascimento o crescimento longitudinal processa-se a partir das cartilagens de crescimento onde ocorre a proliferação de condrócitos que vão depositando um “molde” sob a forma de matriz extracelular. Inicialmente estas células hipertrofiam sofrendo posteriormente um fenómeno de apoptose. O “molde” gerado por estas células sofre então uma deposição de osso primário por parte dos osteoblastos originários das metáfises. Este tecido sofre ainda um processo contínuo de remodelação sob a influência de diversas forças biomecânicas que, segundo a lei de Wolff na qual se postula que a transformação do esqueleto é dependente do exercício de pressões a partir do exterior dos animais, se traduzirá no aspecto e relações anatómicas finais dos ossos e complexos osteoarticulares (van Weeren, 2005).

3.2 OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA

Como já foi referido na secção anterior, a formação óssea dos ossos longos nos mamíferos em crescimento processa-se fundamentalmente através do fenómeno designado por ossificação endocondral. Este processo decorre através da mineralização de um modelo cartilagíneo primário. A ossificação endocondral engloba, dependendo da localização da sua ocorrência, formação do osso subcondral das superfícies articulares do complexo cartilagíneo articular epifisário, o crescimento longitudinal dos ossos ao nível das placas de crescimento metafisário e a produção de centros de ossificação secundários nos ossos cuboidais do tarso e do carpo (Hurtig, 1996; van Weeren, 2005). É um processo essencial na constituição do suporte ósseo subcondral das superfícies articulares (Patsama *et al.*, 1975).

Existem duas zonas de cartilagem de crescimento especializada e que estão presentes em ambas as extremidades dos ossos longos durante o período de crescimento e maturação esquelética. Esta cartilagem de crescimento está presente em ambos os lados dos centros primários de ossificação e é responsável pelo crescimento longitudinal. Em ambas as localizações referidas a cartilagem de crescimento é substituída por osso através de um processo sequencial de proliferação celular, síntese de matriz extracelular, hipertrofia celular, mineralização da matriz e invasão vascular, que se designa por ossificação endocondral (Lefebvre e Smits, 2005).

Os condrócitos da cartilagem de crescimento estão organizados em quatro camadas distintas. A *zona de repouso* contém condrócitos que não sofrem grandes modificações ou divisões e que funcionam como precursores da *zona proliferativa* na qual passam a apresentar uma actividade de divisão rápida. Nesta zona altamente proliferativa vão-se formando colunas de condrócitos que, ao hipertrofiarem, vão segregar e manter uma matriz altamente especializada cuja função é promover a calcificação da cartilagem que serve de modelo à formação de osso por parte dos osteoblastos. Esta é chamada de *zona hipertrófica*. Finalmente, na *zona de mineralização* surge uma invasão de ansas vasculares e de células osteogénicas que ocupam os espaços deixados vagos pelos condrócitos hipertróficos terminais. O factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), produzido pelos condrócitos hipertrofiados, parece ser o factor responsável e necessário pelo crescimento vascular no interior das placas de crescimento (Gerber *et al.*, 1999). Na frente de ossificação, os osteoblastos envolvem as superfícies dos septos longitudinais remanescentes formando a camada

esponjosa primária que consiste em cartilagem calcificada, osso esponjoso e osso lamelar (Ytrehus *et al.*, 2007).

Em suma, a remodelação cartilaginosa, seguida de calcificação da cartilagem, deposição de osso primário, e as sucessivas remodelações até à formação de osso esponjoso é conhecida como ossificação endocondral (Hurtig, 1996).

3.3 O MECANISMO DE REMODELAÇÃO ÓSSEA

Ao longo da vida o tecido ósseo é continuamente formado e reabsorvido através de um processo preciso e regulado conhecido como remodelação óssea, (Frost, 1991; Harris, 1997) que se inicia durante o desenvolvimento fetal e apenas termina aquando da morte do animal (Junqueira e Carneiro, 2005). Este processo decorre em resposta à sua adaptação às mais variadas influências externas como sejam traumatismos, doenças, uso e desuso e até intervenções cirúrgicas, com consequentes implicações em termos de forma e arquitectura interna (Hurtig, 1996; Harris, 1997). A remodelação é o mecanismo primário através do qual o osso cresce e atinge a sua geometria final (Allen, 2003). É do equilíbrio resultante entre a formação e a reabsorção óssea que o osso adquire toda a sua estrutura, qualidade e robustez (Harris, 1997).

Há uma vasta rede de interacções complexas entre vários factores hormonais e factores de crescimento que é responsável pela regulação do metabolismo ósseo (Christenson, 1997). Segundo Davicco *et al.* (1992) o crescimento ósseo é estimulado pela hormona de crescimento (GH) de duas formas: directamente sobre os osteoclastos; e indirectamente através de somatomedinas (Insulin-like growth factors – I e II * IGF-I e IGF-II) e que regulam a produção de GH.

Tendo em conta a importância do processo remodelativo na homeostasia do metabolismo do cálcio e do fósforo, é também importante referir como elementos fundamentais a esta regulação a hormona paratiroideia (PTH) , a calcitonina e a vitamina D.

A PTH, produzida pela paratiróide, provoca um aumento do cálcio sérico através da sua mobilização a partir do osso. De uma forma geral, a PTH afecta a reabsorção óssea através da estimulação da osteólise osteoclástica e osteocítica

(Bélanger *et al.*, 1993) e também aumentando o número de osteoclastos na superfície óssea. Além disso causa uma diminuição relativa do tamanho dos osteoblastos permitindo uma acção mais eficaz por parte dos osteoclastos sobre a matriz óssea (Wasserman, 1989). Já a calcitonina, segregada pela tiróide, tem um efeito oposto inibindo a reabsorção óssea e fazendo descer rapidamente os níveis séricos de cálcio, principalmente em situações de hipercalcémia transitória. Esta hormona é ainda extremamente eficiente na utilização do cálcio absorvido pelo organismo (Wasserman, 1989).

Por sua vez a vitamina D tem como principal função a promoção da absorção intestinal do cálcio.

O processo inicial de remodelação óssea ocorre quando os osteoclastos digerem a superfície óssea e o colagénio ósseo (Arnaud, 1996). Os produtos da quebra das ligações entrecruzadas do colagénio são libertados na corrente sanguínea e posteriormente excretados através da urina (Uebelhart *et al.*, 1995). A segunda fase deste processo consiste na migração dos osteoblastos que sintetizam e segregam proteínas da matriz óssea para esses mesmos locais com o objectivo de manter o equilíbrio homeostático e estrutural. Uma dessas proteínas, a osteocalcina, tem vindo a ser estudada de forma bastante exhaustiva enquanto marcador deste processo (Hauschka e Reid, 1978; Hauschka *et al.*, 1983; Price *et al.*, 1998). Utilizando métodos imunocitoquímicos, a osteocalcina tem vindo a ser detectada principalmente no osso e na dentina (Camarda *et al.*, 1987). É frequentemente utilizada como marcador específico e sensível, na avaliação da taxa de formação óssea em medicina humana (Coleman *et al.*, 1988; Uebelhart *et al.*, 1995) tendo também sido alvo de alguma atenção na medicina e investigação equinas.

Apesar de estarem disponíveis na literatura dados relativos ao metabolismo ósseo em cavalos *standardbred* (Lepage *et al.*, 1990) e em cavalos Puro Sangue Inglês (Price *et al.*, 1995a e 1995b), o facto é que no entanto não existem dados relativos a cavalos de Tiro e aos chamados *warmblood*. O cavalo Puro Sangue Lusitano, pelas suas características raciais, pode ser considerado um *warmblood*.

Nos animais recém-nascidos, a matriz extracelular da cartilagem articular passa por uma fase de intensa e rápida actividade remodelativa. A malha de colagénio da cartilagem articular é moldada sob várias influência bioquímicas num processo distinto daquele que ocorre com o osso (Wolff, 1892). No entanto, apesar do osso conservar a sua capacidade remodelativa ao longo de toda a vida do cavalo, o

metabolismo cartilágneo tem tendência a diminuir rapidamente no início da idade adulta. Desta forma é também interessante constatar que os tempos de remodelação cartilágnea nos animais adultos são bastante mais longos quando comparados com os animais jovens (Maroudas, 1980; Verzijl *et al.*, 2000).

O período de remodelação da rede de colagénio numa fase precoce da vida dos animais constitui-se como um período único durante toda a sua vida com consequências extremamente significativas na abordagem à prevenção das doenças osteoarticulares (Helminem *et al.*, 2000).

Há algumas lesões que, por serem muito grandes ou por aparecerem tardiamente num período da juventude dos cavalos situado entre o primeiro e o 11º meses de vida, não têm tempo para regredir completamente durante esta fase de intenso metabolismo remodelativo (van Weeren, 2005). Após esta janela de sensibilidade as lesões que não regrediram vão acompanhar o cavalo durante toda a sua vida.

No que respeita aos animais com um esqueleto maduro, os processos de reabsorção e formação ósseas estão equilibrados durante o processo remodelativo, não existindo desta forma uma alteração significativa da respectiva massa óssea total. No entanto, à medida que os animais envelhecem, as eficiências relativas de ambos os processos remodelativos podem modificar-se provocando em última análise alterações nesta mesma massa óssea (Allen, 2003).

3.4 IMPACTO DOS PROBLEMAS OSTEOARTICULARES NA CADEIA DE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE CAVALOS

Estberg *et al.* (1996) referem que os problemas musculoesqueléticos são entidades económica e socialmente importantes para a indústria equina. Frisam ainda que as indústrias do desporto e da produção equinas enfrentam consideráveis perdas económicas devidas a problemas musculoesqueléticos que ocorrem nos cavalos numa fase precoce da sua vida ou em qualquer altura da sua utilização desportiva, treino ou competição. De um modo geral, os traumatismos sofridos pelo sistema musculoesquelético dos cavalos são uma das principais causas da alta morbidade e mortalidade nesta espécie (Price *et al.*, 1995).

Também segundo Bathe (1994), os distúrbios do esqueleto equino que surgem em consequência de lesões e/ou do desenvolvimento ortopédico inadequado são um problema grave em termos de bem-estar e que resultam não só em elevados índices de morbidade e mortalidade mas também em importantes perdas económicas.

No Reino Unido, um estudo efectuado em 1985 por Rosedale *et al.* revelou que a principal causa de reforma da competição de cavalos jovens de raça Puro Sangue Inglês seriam as claudicações, sendo as doenças articulares as figuras mais proeminentes destas alterações. Também na análise de um estudo retrospectivo realizado na Universidade de Cornell foi possível observar que dos cavalos admitidos no Hospital de Grandes Animais entre os anos de 1983 e 1987, cerca de 20% foram alvo de exames de claudicação e destes cerca de 40% tinham como principal problema uma doença articular (Todhunter, 1996).

A OC é das DOD aquela que apresenta um maior impacto económico. As perdas da indústria equestre devido à OC, tanto em aspectos económicos como de bem-estar animal, são inaceitavelmente elevadas. Esta afecção assume uma importância particularmente elevada em cavalos warmblood e em cavalos *standardbred* (van Weeren e Barneveld, 1999).

É consensual a urgência na resolução da problemática da OC (Hurtig, 1996). Este facto deverá mobilizar criadores, treinadores e médicos veterinários num esforço conjunto de estreita cooperação com vista à eliminação progressiva desta entidade patológica (Pool, 1996).

A grande percentagem de cavalos retirados da competição devido a problemas esqueléticos poderá ser reduzida se os veterinários conseguirem reconhecer precocemente e monitorizar a evolução de alterações nas respostas adaptativas do osso ao exercício físico, ou se conseguirem antecipar e reconhecer o desenvolvimento de condições patológicas tais como a OC (Hurtig *et al.*, 1991; Girard *et al.*, 1997).

3.5 PRINCIPAIS MANIFESTAÇÕES PATOLÓGICAS DOS DISTÚRBIOS OSTEOARTICULARES EM CAVALOS

A manutenção de uma função articular normal é uma das principais preocupações dos médicos veterinários de cavalos (Todhunter, 1996).

Das principais doenças que afectam as articulações as mais relevantes são sem dúvida as osteoartrites e as DOD. Em 1978 Olsson e Reiland consideraram a OC como sendo a principal causa primária de osteoartrite em porcos e em cavalos.

Nos cavalos as lesões articulares ocorrem tanto durante a fase de treino e desbaste como durante a competição desportiva ou certos tipos de trabalho específico. Surgem como resultado de forças biomecânicas de grande intensidade, duração e/ou frequência que são exercidas sobre os tecidos cartilágneo, ósseo, sinovial e fibroso que constituem o complexo osteoarticular (Pool, 1996).

Os padrões lesionais osteoarticulares que surgem em cavalos de desporto reflectem as forças a que são sujeitas as estruturas articulares, sendo também influenciadas pela raça e pela idade do cavalo (Pool, 1996).

É pois reconhecido que existe uma necessidade urgente de identificar os indivíduos afectados pela OC numa fase tão precoce quanto possível, uma vez que o recurso a meios de tratamento conservativo nesta fase pode ajudar estes animais a recuperar a sua capacidade atlética, atenuando o conseqüente impacto degenerativo a que estão sujeitos (McIntosh e McIlwraith, 1993).

3.5.1 OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) representa um distúrbio crónico do complexo osteoarticular que é caracterizado por uma deterioração progressiva da cartilagem articular (Pool, 1996). Além de progressiva esta perda é também permanente (McIlwraith, 1996). Ainda que em graus variáveis, na grande maioria dos casos é possível identificar radiograficamente alterações consistentes com este distúrbio tais como a redução do espaço articular e a formação de alterações reactivas nas margens articulares e nas inserções de estruturas como as cápsulas sinoviais (Pool, 1996) correspondendo à formação de osteófitos e enteseófitos respectivamente.

Muitos dos diferentes distúrbios articulares podem progredir para um tipo mais ou menos uniforme de padrão lesional consistente com as alterações de OA (Pool, 1996). Tendo em conta que os estímulos nocivos ao complexo osteoarticular podem ocorrer em qualquer idade, as causas predisponentes de OA incluem: a OC, as alterações de conformação e aprumos, algumas alterações do desenvolvimento, os

traumatismos repetidos e intensos sobre as estruturas osteoarticulares, as infecções articulares e o uso inadequado de algumas medicações (ex.: corticosteróides) (Pool, 1996). McIlwraith (1996) considerou ainda que os factores etiológicos envolvidos no desenvolvimento das artrites equinas poderiam ser divididos em três grandes grupos: traumáticos, de desenvolvimento e infecciosos.

Relativamente à OC, que adiante se refere de forma mais exaustiva, é possível identificar situações de OA como repercussão secundária das lesões primárias de OC. Quanto a este aspecto há ainda quem refira que os estudos relativos à OC têm sido orientados para presença de lesões clínica e radiograficamente manifestas nas quais o processo de necrose e regeneração articular não é mais que uma fase precoce de OA (Ytrehus *et al.*, 2007).

3.5.2 OSTEOCONDROSE

A OC é um distúrbio comum da cartilagem de crescimento nos animais domésticos e no homem (Bohndorf, 1998). Nos animais domésticos está descrita em porcos (Dewey, 1999), cães (Morgan *et al.*, 1999), cavalos (McIlwraith, 2002), bovinos (Jensen *et al.*, 1981), gatos (Ralphs, 2005) e ratos (Kato, 1987).

A OC é, traduzida à letra, uma condição osteo-cartilágnea. É considerada a causa mais comum de fraqueza dos membros em porcos (Jørgensen *et al.*, 1995) e é uma causa frequente de claudicação em animais de desporto jovens, nomeadamente em cavalos (McIlwraith, 2002) e em cães (Harari, 1998). A OC surge nas mais variadas localizações nas diferentes espécies animais, nomeadamente em porcos, cães, cavalos e no homem (Ytrehus *et al.*, 2007).

Na literatura que aborda esta problemática relacionada com a OC é possível encontrar muitas vezes a referência à terminologia de osteocondrite e osteocondrite dissecante (OCD). Ainda que muitas vezes possam ser utilizados como sinónimos estes termos têm sido diferenciados por forma a identificar cada um deles separadamente. A OC é o distúrbio sendo a osteocondrite a resposta inflamatória a esse distúrbio. Por sua vez a OCD é a condição na qual é identificável uma depressão e/ou a presença de um *flap* cartilágneo (Poulos, 1986). Este processo de lesão da superfície articular geralmente progride com sinais de inflamação e efusão sinovial (Hurtig, 1996).

Os termos osteocondrite e osteocondrose só começaram a ser usados em medicina veterinária a partir dos anos 60. No entanto o termo osteocondrite tem vindo a ser progressivamente substituído pelo termo osteocondrose por muitos cientistas (Howald, 1942) uma vez que é opinião generalizada que a inflamação não é um elemento característico das lesões primárias deste processo patológico. Os primeiros estudos que utilizaram esta designação basearam-se nas lesões presentes na articulação escapuloumeral de cães. No entanto também foi considerado apropriado para definir as lesões associadas à fragilidade dos membros em porcos (Ljunggren, 1969).

Os estudos realizados em porcos por Grøndalen (1974a; 1974b) propuseram que o termo OC deveria ser aplicado aos “distúrbios localizados, primariamente não inflamatórios, que ocorrem durante o processo de ossificação endocondral nas placas epifisárias e na cartilagem articular sem lesões cartilagíneas superficiais”. No entanto Reiland (1975) também postulou que a “OC era uma doença de cariz generalizado em porcos, caracterizada por um distúrbio na ossificação endocondral”. Estas definições consideram duas perspectivas diferentes da mesma situação, a generalização do processo *versus* a sua caracterização como processo focal.

Por outro lado Ytrehus *et al.* (2007) também refutaram a ideia de que as lesões de OC seriam generalizadas *per se* uma vez que as lesões típicas são de natureza focal. As lesões podem sim aparecer em múltiplas localizações num mesmo indivíduo sendo até frequente a ocorrência de lesões bilaterais simétricas. Também este autor, apesar de considerar como mais apropriada e aceitável a designação OC para definir o distúrbio que afecta a cartilagem de crescimento e a sua transformação em osso, considerou porém ser necessário identificar mais em concreto as lesões nos diferentes estádios de desenvolvimento do processo patológico. Para tal propôs a inclusão das designações *latens* para identificar a presença de uma área focalizada de necrose cartilagínea confinada à cartilagem epifisária, *manifesta* para a presença de uma falha localizada na ossificação endocondral visível quer em exames macroscópicos quer em exames radiográficos, e por fim *dissecans* nos casos em que se forma uma fissura na área da cartilagem necrótica e que se estende através da cartilagem articular sob a forma de um *flap* cartilagíneo.

A OC nos animais domésticos refere-se genericamente à evidência de defeitos localizados na cartilagem e no osso subcondral sendo a principal causa primária de osteoartrite nos animais domésticos, em particular em porcos e cavalos (Olsson e Reiland, 1978). Em 1996, Hurtig definiu esta entidade de uma forma bastante genérica e sucinta como sendo a tradução clínica de uma anomalia no processo de formação óssea e cartilagínea.

Os estudos realizados têm causado alguma confusão em particular no que diz respeito à formação das lesões primárias. Isto pode dever-se ao facto de estes estudos darem, de um modo geral, maior ênfase às lesões quando estas são clínica e radiograficamente identificáveis e não numa fase mais precoce do seu desenvolvimento. Nestas fases da doença, em que as lesões apresentam já um certo grau de cronicidade, a informação obtida reflecte apenas as alterações degenerativas secundárias às lesões e o respectivo processo regenerativo, e não os processos primários de formação das lesões (Bertone *et al.*, 2005).

A lesão primária de OC representa uma falha localizada no processo de ossificação endocondral, ou seja, uma área da cartilagem de crescimento que não sofre transformação em matriz calcificada nem invasão vascular, e conseqüentemente não é convertida em osso (Ekman e Carlson, 1998).

As lesões características de OC ocorrem precisamente no momento em que a massa espessa de cartilagem na face articular epifisária, que funciona como uma verdadeira cartilagem de crescimento, assume o seu aspecto final de cartilagem articular consideravelmente fina na sequência dos processos contínuos de crescimento, remodelação e ossificação característicos da ossificação endocondral (van Weeren, 2005).

A OC foi inicialmente descrita como sendo uma doença estática num sentido lato, *i.e.*, uma vez instalada não apresenta possibilidade de regressão espontânea. No entanto este conceito tem vindo a ser progressivamente alterado. Alguns estudos, nos quais foi feito o acompanhamento da evolução de lesões de OC desde um período muito precoce da vida de algumas populações de cavalos, evidenciaram uma tendência claramente evolutiva destas lesões. É interessante observar que, num período que varia entre o primeiro e o 11^o meses de vida, lesões que são claramente visíveis numa fase inicial desaparecem em avaliações subseqüentes (Dik *et al.*, 1999). E isto é tão verdade para lesões discretas de remodelação subcondral como para lesões maiores que inclusivamente apresentavam fragmentos livres de dimensões consideráveis.

Este mesmo estudo, conduzido por Dik *et al.* (1999), revelou que as lesões que eram patentes logo no primeiro mês de idade na crista sagital da tibia distal e na região distal da eminência troclear lateral do astrágalo se tornaram radiograficamente

indetectáveis aos cinco meses de idade. Já para a articulação femoropatelar foi possível verificar que, até aos oito meses de idade, o número e a gravidade das lesões identificadas nas avaliações anteriores realizadas aos três e cinco meses sofreu um declínio muito significativo.

Estas observações levaram à conclusão de que a OC não é de forma alguma uma doença estática aparecendo, em claro contraste com as noções anteriormente estabelecidas, como uma entidade extremamente dinâmica na qual as lesões podem regredir e inclusive desaparecer durante os primeiros meses da vida de um cavalo (van Weeren e Barneveld, 1999).

Os factores que têm vindo a ser implicados na etiologia da OC incluem o crescimento acelerado, a hereditariedade, características anatómicas, traumatismos, factores nutricionais e alterações no aporte vascular à cartilagem epifisária. No entanto, alguns destes factores são alvo de crítica numa análise realizada recentemente por Ytrehus *et al.* (2007) a muita da literatura científica que aborda esta problemática. Nesta revisão o autor acaba por refutar muitas das hipóteses que davam estes factores como elementos essenciais ao desenvolvimento das lesões de OC como adiante se refere.

A literatura científica relacionada com os eventuais factores etiológicos da OC, e que existe até à data, tem conseguido provas relativamente fortes sobre a implicação da genética e das características anatómicas na etiologia desta doença. Por outro lado existem poucas ou nenhuma evidências sobre a implicação do crescimento acelerado, dos traumatismos severos ou dos factores dietéticos no desenvolvimento deste distúrbio (Ekman *et al.*, 1998; Ytrehus *et al.*, 2004a; Ytrehus *et al.*, 2004b).

À osteocondrose não pode ser atribuída uma causa específica e bem determinada (Billinghurst *et al.*, 2004; van Weeren, 2005). Há no entanto um conjunto de factores frequentemente implicados na patogenia desta doença, tais como a predisposição genética, os traumatismos únicos ou reiterados, os fenómenos isquémicos locais e algumas disfunções endócrinas (Hurtig, 1996; van Weeren, 2005). Na grande maioria dos casos a OC é identificada na sua forma crónica. Nestes casos não se espera uma evolução favorável na remissão das lesões, sendo necessário recorrer a uma abordagem cirúrgica como opção terapêutica, por forma a evitar o desenvolvimento ou o agravamento de subseqüentes situações de osteoartrite (Billinghurst *et al.*, 2004). A grande maioria das vezes a OC apenas é identificada clinicamente quando os animais iniciam o desbaste e conseqüente trabalho mais

intenso. As lesões secundárias à OC que podem ser identificadas nesta altura, apesar de serem importantes e radiograficamente significativas, podem nunca ter apresentado qualquer indício clínico da sua presença ou relevância.

A ocorrência de OC em várias articulações do cavalo tem uma etiologia multifactorial. Factores nutricionais, bem como genéticos e biomecânicos são sugeridos como factores contributivos para o desenvolvimento deste problema (Philipsson, 1996). Ainda que a natureza multifactorial da osteocondrose tenha vindo a ser amplamente reconhecida, o inter-relacionamento entre os factores envolvidos na origem da doença permanece ainda muito pouco esclarecido (Hurtig, 1996).

São muito variados os factores considerados como contributivos para o desenvolvimento da OC. Destes também têm vindo a ser frequentemente referidas as práticas alimentares intensivas, a propensão hereditária para crescimentos rápidos, a deficiência moderada em Cobre, uma inadequada relação Cálcio/Fósforo (Ca/P) presente na dieta, quantidades de hidratos de carbono uma vez e meia superiores às necessidades segundo as recomendações do NRC, os defeitos de conformação e a falta de exercício físico entre outros factores (Hurtig, 1996).

Estão descritas três categorias de lesões de OCD em cavalos: (1) as que apresentam sinais clínicos e sinais radiográficos, (2) as que apresentam sinais clínicos mas não apresentam sinais radiográficos (ainda que possam apresentar sinais visíveis por artroscopia) e (3) as que apresentam sinais radiográficos mas não apresentam sinais clínicos (McIlwraith, 1996).

Nos cavalos são reconhecidas lesões na face caudal da superfície articular proximal do úmero, na face medial do côndilo umeral, na eminência troclear lateral do fémur, no côndilo medial do fémur, na crista intermédia da tibia distal, na eminência troclear lateral do astrágalo e na face dorsal do metacarpo e metatarso distais (Pool, 1993; McIlwraith, 2002) entre outros (Ytrehus *et al.*, 2007).

Hoppe e Philipsson (1985) observaram, numa caracterização radiográfica de *warmbloods* e *standardbreds* suecos, uma prevalência entre 10% e 26% de OC nas articulações tarsocrurais. Já na Holanda, Veen *et al.* (1994) observaram para as mesmas articulações uma incidência de 14%. Com base nestes números e em estimativas anteriores, van Weeren afirmou ser possível fazer uma estimativa credível quanto à incidência de OC incluindo todas as articulações e todas as lesões mesmo as radiograficamente ocultas. Esta estimativa apontaria para uma incidência global de

pelo menos 20% a 25%. Foi também afirmado que estimativas realísticas de valores de incidência de OC, em grandes grupos de cavalos, variam entre os 5% e os 20% (Alvarado *et al.*, 1989; O'Donohue *et al.*, 1992).

Os valores relatados na literatura quanto à incidência de OCD do tarso, incluindo lesões na crista intermédia da tíbia distal bem como as lesões da eminência troclear lateral do astrágalo, variam entre 10% e 26%. Segundo os estudos destes mesmos autores, estas lesões eram bilaterais em cerca de 50% dos animais afectados (Hoppe, 1984; Sandgren *et al.*, 1988; Alvarado *et al.*, 1989; Grøndhal, 1991; Jørgensen *et al.*, 1997).

Em cavalos jovens de raças *standardbred*, foram também relatados valores de 14% a 29% de incidência de OC nas articulações metacarpo- e metatarsofalângicas (Sandgren *et al.*, 1988; Carlsten *et al.*, 1993; Sandgren *et al.*, 1993; Jørgensen *et al.*, 1997).

Curiosamente um estudo efectuado em cavalos silvestres com aproximadamente 12 meses de idade apresentou valores de OCD de aproximadamente 5% nos boletos e de 1% nos tarsos (Valentino *et al.*, 1999).

3.6 IMPACTO DO EXERCÍCIO NO PROCESSO DE REMODELAÇÃO ÓSSEA E NA PATOGENIA DA OSTEOCONDROSE

Apesar da sua robustez, o osso é um tecido vivo em constante actividade de substituição e remodelação. A sua forma e composição são influenciadas por diversos factores dos quais se destacam as forças de *stress* mecânico a que o tecido ósseo está sujeito e, ainda nesta perspectiva, ao grau de uso ou desuso ao qual está também sujeito (Junqueira e Carneiro, 1995).

Existem numerosos estudos a demonstrarem que as células ósseas são directamente sensíveis a influências mecânicas (Rubin e Lanyon, 1984; Pead *et al.*, 1988; Skerry *et al.*, 1989). Há ainda outros estudos que demonstram que a existência de alterações na arquitectura óssea em cavalos atléticos em resposta ao exercício físico é consistente com os níveis de renovação óssea observados nesses mesmos animais (Young *et al.*, 1989; McCarthy e Jeffcott, 1992).

Num estudo conduzido por Harris (1997) é também referido que a actividade mineral óssea é mais intensa quando há uma maior sujeição a esforços, entenda-se exercício físico.

Muitos têm sido os estudos acerca da influência do exercício sobre o sistema musculoesquelético dos cavalos, principalmente em animais de corrida (Puro Sangue Inglês) (Jackson *et al.*, 2003; Billinghamurst *et al.*, 2004). Dos muitos factores que influenciam a arquitectura do esqueleto, a actividade física é provavelmente a mais importante (Price *et al.*, 1995a).

Um nível de exercício adequado é essencial ao normal desenvolvimento quer de ossos quer de articulações. Segundo Gabel (1988), para que ocorra um desenvolvimento normal do sistema musculoesquelético em poldros, estes necessitam de cerca de 12 horas de exercício livre por dia.

Em 2003, Jackson *et al.* observaram uma taxa de renovação óssea inferior em animais sujeitos a exercício intenso quando comparados com animais em grupos controlo. Observou também que o aumento da taxa de renovação óssea pode corresponder à resposta a uma carga mecânica inadequada ou ao resultado de uma situação de desuso ósseo (Jackson *et al.*, 2003).

Os processos de remodelação óssea são necessários à adaptação do esqueleto ao *stress* mecânico. Uma falha desta resposta adaptativa pode conduzir a lesões e a alterações do esqueleto (Vervuert *et al.*, 2002). Neste particular, as células ósseas presentes nos ossos em crescimento de animais jovens são mais sensíveis a alterações no seu ambiente mecânico e às forças de carga a que são sujeitas, do que estas mesmas células em animais adultos (Jackson *et al.*, 2003).

O papel do exercício físico no período de desenvolvimento das cartilagens durante o primeiro ano de vida é crucial não só para a remodelação normal do tecido cartilágneo articular mas também para a sua possível contribuição no desenvolvimento de lesões osteocondrais (van Weeren, 2005).

Jeffcott (1997) também afirmou, na sequência da análise de vários estudos de referência, que níveis de exercício progressivamente mais intensos podem ser benéficos quando os animais são alimentados com elevados níveis energéticos. Este pressuposto pode no entanto não ser aplicável a casos em que já existem lesões de OCD.

No entanto, a observação de alguns estudos de semelhante delineamento experimental permitiu distinguir resultados aparentemente contraditórios entre eles. Se

por um lado alguns estudos evidenciaram números elevados de incidência de OC em animais sujeitos a níveis de exercício de baixa intensidade, tal como sucedeu com Jeffcott (1991) em que um grupo sujeito a um nível de exercício mais intenso apresentou 6% de animais afectados em contraste com os 20% encontrados no grupo de exercício de menor intensidade, por outro lado outros estudos revelaram resultados totalmente opostos com valores de incidência significativamente superior nos grupos de animais sujeitos a regimes de exercício mais intensos (van Weeren e Barneveld, 1999).

É possível que o exercício físico seja efectivamente um factor co-determinante no aspecto e na localização final das lesões de OC. No entanto não parece ter por si só um papel preponderante na patogenia destas lesões. Ainda assim, e no que à patogenia da OC diz respeito, as cargas biomecânicas desempenham neste processo um papel fundamental. Esta observação é corroborada pela evidência da existência de alguma predilecção para a localização das lesões em regiões específicas das articulações (van Weeren, 2005).

Van Weeren (2005) também sugeriu que as alterações dramáticas que surgem em consequência da carga biomecânica exercida imediatamente após o parto pode constituir um factor determinante no aparecimento destas lesões.

As cargas biomecânicas exercem uma influência importante no processo de ossificação endocondral em dois períodos distintos. Numa primeira fase do processo actuam através da redução do aporte vascular à cartilagem neonatal. Mais tarde, numa segunda fase, podem determinar a formação e o desprendimento de *flaps* cartilagíneos em situações de ossificação endocondral defeituosa (van Weeren, 2005). As localizações típicas das lesões correspondem a áreas de elevada carga biomecânica e também a áreas cuja cartilagem em desenvolvimento é espessa e possui uma fraca irrigação sanguínea (Hurtig, 1996).

Estas influências biomecânicas estão intimamente relacionadas com outros factores etiológicos de OC tais como o nível de exercício físico e a genética (esta última através da determinação da conformação do animal). Este factor é assim considerado um factor aditivo necessário ao desenvolvimento da doença mas não elemento único na origem das lesões de OC (Dik *et al.*, 1999).

Olsson e Reiland (1978) consideraram que para que decorresse o desenvolvimento de uma situação de OC era necessária a existência de alguns pressupostos essenciais: teria que haver a presença de cartilagem em crescimento, sujeita a rápidos ritmos de crescimento e sob a influência de práticas alimentares intensivas. No entanto, Nakano e Aherne (1988) referem a necessidade da existência de um factor mecânico associado aos restantes pressupostos considerados e que pudesse actuar como factor desencadeador da doença.

Um dos factores que aponta mais fortemente para a etiologia traumática das lesões de OC refere-se à localização destas, uma vez que surgem em áreas específicas em quase todas as espécies e que são em geral áreas sujeitas a um maior *stress* biomecânico. Além disso é possível verificar que a prevalência e a severidade das lesões aumenta em situações de maior carga tal como acontece na prática desportiva em geral (Ytrehus *et al.*, 2007).

No entanto, o papel do traumatismo na patogénese da OC pode depender da fase da doença que é considerada, ou seja, ainda que uma situação traumática possa converter uma situação de OC *manifesta* em OC *dissecans*, o nível de traumatismo necessário à ocorrência desta alteração é em geral mínimo e pode envolver forças tão diminutas como as que se desenvolvem no processo normal de locomoção (Ytrehus *et al.*, 2007).

A evidência de grandes traumatismos não parece ser suficiente para determinar o aparecimento de lesões em articulações normais podendo no entanto desempenhar o mesmo papel atrás referido na conversão de processos de OC *manifesta* em OC *dissecans* (Ytrehus *et al.*, 2007).

3.7 OUTRAS VARIÁVEIS IMPORTANTES NO PROCESSO DE REMODELAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ÓSSEO E NA PATOGENIA DA OSTEOCONDROSE

3.7.1 Alimentação

São muitos os factores dietéticos sugeridos como potenciais causas de OC nos animais, nomeadamente em porcos (Nakano *et al.*, 1987).

Nos animais, e ainda que não através da sua acção única, os factores nutricionais são uma das causas mais comuns de displasias esqueléticas, de deformações apendiculares e também de fragilidade óssea (Palmer, 1993).

Em porcos, os desequilíbrios no equilíbrio cálcio-fósforo de alguns suplementos alimentares, a sobresuplementação com zinco, as deficiências em vitaminas C, D e A, as deficiências em biotina e ainda a acidose metabólica crónica são alguns destes factores (Nakano *et al.*, 1987).

No entanto, nestes estudos realizados em porcos nos quais também se procurou suplementar as eventuais deficiências anteriormente referidas, bem como contrariar o estado de acidose metabólica também assinalada recorrendo à suplementação com bicarbonato de sódio, não conseguiram produzir efeitos significativos nas prevalências e/ou na severidade das lesões de OC (Nakano *et al.*, 1987).

Uma dieta equilibrada e suplementada com micronutrientes reduz significativamente a incidência de problemas do desenvolvimento ósseo e articular. No entanto, estas medidas não são suficientes para erradicar completamente a OC continuando a ser possível aparecerem casos esporádicos desta afecção (Hurtig, 1996).

Desde muito cedo que as pesquisas sobre OC equina se focaram grandemente na avaliação de factores nutricionais potencialmente implicados na patogenia da OC. Os estudos conhecidos basearam-se principalmente em factores como os níveis energéticos das dietas e também nos níveis de minerais e microelementos, de que são exemplo o cobre e o zinco, e em menor grau os níveis de cálcio e fósforo (Pool, 1993; Savage *et al.*, 1993).

A energia da dieta está intimamente relacionada com o ritmo de crescimento, o qual tem sido considerado como sendo um factor importante na patogenia da OC em diversas espécies. No entanto, o ritmo de crescimento não é só condicionado pelo aporte energético de uma dieta mas também por outros factores como a predisposição genética individual.

Tal como já foi anteriormente referido relativamente aos trabalhos de Olsson e Reiland, as práticas alimentares intensivas parecem ser um dos elementos determinantes no desenvolvimento da OC.

A ideia de que os elevados níveis energéticos de uma dieta podem condicionar um maior ritmo de crescimento e conseqüentemente uma maior pressão biomecânica sobre o processo de ossificação endocondral originando irregularidades subcondrais e

cartilagíneas possivelmente osteocondróticas é no entanto considerada demasiado simplista por van Weeren (2005).

No entanto, há alguns aspectos que importa registar. Os níveis excessivos de energia, principalmente quando fornecidos na forma de hidratos de carbono facilmente digestíveis, resultam no desenvolvimento de uma hiperinsulinemia pós-prandial severa (Glade, 1986 e 1987). A insulina e alguns factores de crescimento (*Insulin-like Growth Factors* – IGF-I e IGF-II) exercem um efeito directo sobre o processo de ossificação endocondral, actuando como mitogénios sobre os condrócitos, estimulando a sua sobrevivência ou suprimindo a sua apoptose (Henson *et al.*, 1997). A insulina também promove uma remoção rápida das hormonas tiroideias T3 e T4 da circulação sanguínea (Glade e Belling, 1984). Estas hormonas estão envolvidas nos fases finais de diferenciação condrocítica e na invasão metafisária das cartilagens de crescimento por parte de vasos sanguíneos (Jeffcott, 1998). Desta forma, os níveis elevados de hidratos de carbono induziriam um estado de hipotiroidismo transitório potenciando um retardamento na maturação das cartilagens de crescimento. Estas observações e as suas implicações sobre a fisiologia osteocondral revelam aspectos muito interessantes no que respeita aos estudos sobre a patogenia da OC.

Alguns estudos comprovam que é possível induzir o aparecimento de lesões cartilagíneas através do recurso a uma alimentação baseada em dietas com níveis elevados de energia digestível (Shavers *et al.*, 1979). No entanto não se pode imputar unicamente a este factor o papel principal no desenvolvimento de lesões de OC. Além disso o facto de muitas das lesões, cuja principal causa seria a administração de níveis elevados de energia digestível, terem sede nas cartilagens de crescimento (Glade e Belling, 1984) e de só muito raramente se encontrarem lesões de OC nesta localização em cavalos, reforça a ideia que estes são factores, que apesar de contribuírem de forma evidente e decisiva para o aparecimento e desenvolvimento de lesões de OC, não são de forma alguma elementos únicos na patogenia deste processo.

O crescimento acelerado, apesar de ter vindo a ser amplamente considerado como factor importante na etiologia da OC, encontra alguma contradição através de outras referências na literatura que não corroboram este facto, nomeadamente tendo como exemplo outras espécies além do cavalo.

Em porcos, e reduzindo o ritmo de crescimento através da redução do nível alimentar, não foi possível diminuir significativamente a prevalência de lesões de OC

(Grøndalen, 1974c; Nakano *et al.*, 1979; Woodard *et al.*, 1987; Carlson *et al.*, 1988). Da mesma forma também foi possível verificar que os animais que apresentaram ritmos de crescimento mais lentos não apresentam necessariamente frequências mais baixas de OC (Ekman *et al.*, 1990). Outros estudos, no entanto, verificaram a existência de uma correlação genética positiva entre o crescimento acelerado e as prevalências de OC (Kugler *et al.*, 1979; Kato e Onodera, 1987).

Alguns estudos realizados em cães evidenciaram prevalências equivalentes em animais alimentados *ad libitum* quando comparados com animais sujeitos a restrições alimentares (De Lahunta, 1974). Este facto também não apoia a teoria da influência do crescimento acelerado na etiologia da OC.

Noutros estudos em cavalos considerou-se que um aumento da insulina sérica e uma diminuição da tiroxina, alterações usuais em resposta a dietas de elevados níveis energéticos, conduziam a uma deficiente maturação e hipertrofia dos condrócitos levando à formação de núcleos cartilagíneos que sofreriam necrose quando sujeitos a forças biomecânicas produzindo lesões semelhantes à OC dos porcos (Jeffcott e Henson, 1998). Esta teoria é no entanto contrariada pela morfologia inicial das lesões em que há zonas de necrose bem demarcadas na cartilagem epifisária (Carlson *et al.*, 1995). A formação de núcleos cartilagíneos seria secundária e causada pela resistência da cartilagem ao processo de mineralização e vascularização. Por outro lado também não explica o porquê da ocorrência de lesões focalizadas em sítios específicos e não uma generalização da ocorrência de lesões.

Os desequilíbrios na relação cálcio:fósforo das dietas são outro dos aspectos importantes no desenvolvimento de problemas ortopédicos com particular relevância na fase de crescimento. Num estudo realizado por Savage *et al.* (1993) foi possível constatar que níveis elevados de cálcio na dieta não influenciaram a incidência de OC em poldros. No entanto, níveis elevados de fósforo (quatro vezes superiores aos valores recomendados pelo NRC) resultaram num número significativamente maior de lesões observadas. Supõe-se que estes desequilíbrios possam condicionar um estado de hiperparatiroidismo nutricional secundário que enfraqueça a estrutura do osso subcondral originando um maior número de lesões de tipo osteocondral.

O cobre tem um efeito positivo na reparação de lesões osteocondrais mas não sobre a sua patogenia (van Weeren e Brama, 2003). No entanto, num modelo experimental que pretendia induzir o aparecimento de lesões de tipo osteocondrótico em poldros, foi possível conseguir com uma dieta com uma elevada deficiência em

cobre (1 ppm) o aparecimento de OC em 100% dos animais em estudo (Bridges e Harris, 1988).

Em cavalos, as lesões observadas em associação com baixas concentrações séricas ou hepáticas de cobre são de uma forma geral severas, extensas e envolvem múltiplas articulações. Estas, apesar de não serem semelhantes às lesões de OC que ocorrem naturalmente, são no entanto muito semelhantes àquelas observadas nas deficiências de cobre em bovinos (Hurtig *et al.*, 1993). As lesões multifocais com origem em dietas pobres em cobre são descritas como lesões de origem nutricional (Hurtig, 1996).

Pool (1993) refere, corroborando estas observações, que a OC induzida pelo zinco ou pela deficiência em cobre em cavalos poderá ser um tipo de doença diferente da OC. Importa também referir que a deficiência em cobre é uma doença sistémica enquanto que a OC é confinada à cartilagem e a algumas articulações (Ytrehus *et al.*, 2007).

Há já hoje em dia uma crescente sensibilização dos próprios criadores para a importância da alimentação e dos micronutrientes no bom desenvolvimento ortopédico dos seus animais. Estes têm vindo a aperceber-se que uma dieta equilibrada e suplementada com os necessários micronutrientes reduz significativamente a incidência de distúrbios do desenvolvimento ósseo e articular. No entanto estas medidas não erradicam a OC, e casos esporádicos continuam a aparecer (Hurtig, 1996). Apesar de tudo, e tendo em conta todas as referências anteriormente descritas, os estudos que procuraram estabelecer uma ligação entre os factores dietéticos e a OC têm, de um modo geral, falhado nos seus propósitos (Nakano *et al.*, 1987).

3.7.2 Hereditariedade

As diferenças verificadas nas prevalências de OC entre diferentes raças e diferentes linhagens de porcos (Grøndalen, 1974b; Grøndalen e Vangen, 1974; van de Wal *et al.*, 1980; Jørgensen e Andersen, 2000), cães (LaFond *et al.*, 2002), e cavalos (Grøndal e Dolvik, 1993) são altamente sugestivas da existência de um componente hereditário na patogénese da OC. No entanto as estimativas de heritabilidade apresentam grandes variações consoante as espécies, o tipo de lesões e até a sua

localização, sendo que os estudos mais exaustivos foram realizados em porcos (Stern *et al.*, 1995; Jørgensen e Andersen, 2000; Yazdi *et al.*, 2000)

Vários estudos realizados em diferentes espécies já provaram que os factores hereditários contribuem para uma maior incidência de OC. No entanto, e apesar da sua reconhecida importância, os estudos genéticos têm sido manifestamente insuficientes (Philipsson, 1996). Philipsson reconheceu ainda que a heritabilidade de um determinado número de manifestações de OC, incluindo a OC das articulações tarsocrurais, era muito elevada. Hurtig (1996) também considerou as lesões da crista sagital da tibia distal como sendo lesões de tipo hereditário.

Algumas estimativas de heritabilidade revelaram valores muito variados para um mesmo tipo de lesões pesquisadas. Ainda assim valores de heritabilidade iguais ou superiores a 0,25 são, segundo van Weeren (2005), suficientemente elevados para poder condicionar um processo de selecção.

Um facto interessante a registar resulta da constatação de que em pôneis só muito raramente são observadas lesões de OC (Voûte *et al.*, 1997). A suportar estas observações importa também referir que alguns estudos efectuados em cavalos silvestres evidenciaram incidências muito baixas de OC (Valentino *et al.*, 1999). Outros estudos em diferentes grupos de garanhões e respectiva descendência corroboraram estas observações evidenciando diferenças significativas no que respeita à incidência de OC (Strömberg e Rejnö, 1978; Schougaard *et al.*, 1990). Este conjunto de observações sugere a existência de uma influência genética na patogenia da OC (van Weeren, 2005). Não parece existirem grandes dúvidas de que a OC é sem dúvida uma condição poligénica com um complexo método de hereditariedade (Philipsson, 1996).

Alguns livros genealógicos têm já vindo a implementar esquemas de selecção baseados nesta premissa. No entanto, os resultados da selecção baseada nestes dados têm sido bastante desencorajadores.

O Royal Dutch Warmblood Studbook (KWPN) tem, desde 1984, rejeitado sistematicamente todos os candidatos com o mínimo sinal radiográfico de OC na articulação tarsocrural e , desde 1992, se apresentassem sinais de OC femoropatelar. Todavia, e até há bem pouco tempo, não foi observada para estas duas localizações uma redução significativa na incidência de OC. Em contraste, lesões de esparavão ósseo ou de doença do navicular sofreram reduções muito drásticas através da

implementação desta mesma política (van Weeren, 2005). Importa no entanto referir que estas duas patologias têm ambas um carácter eminentemente degenerativo e não são consideradas DOD como acontece na OC.

Estes dados têm no entanto algumas hipóteses explicativas. Em primeiro lugar pensa-se que possam estar envolvidos diferentes genes relativamente ao desenvolvimento de OC em articulações distintas (Glade e Belling, 1984). Em segundo lugar, a natureza dinâmica das lesões de OC pode permitir que os animais submetidos a um processo de selecção cerca dos 3 a 4 anos de idade já não tenham evidências radiográficas de OC, ainda que em poldros as possam ter manifestado. Neste caso, apesar de poderem estar geneticamente predispostos a perpetuar a doença, serão aprovados na selecção para reprodutores (van Weeren, 2005).

Muitos autores têm sugerido a existência de uma predisposição genética para as DOD em cavalos. Na Dinamarca, Schougaard *et al.* (1990) examinaram todos os poldros de ano descendentes de nove gananhões *standardbred* relativamente à presença de lesões de OCD na articulação tarsocrural. As descendências de dois dos gananhões evidenciaram uma incidência bastante mais elevada de lesões (25,9% e 30,0% dos poldros) quando comparada com as descendências dos restantes sete (3,4%-18,5%). No entanto nenhum desses dois gananhões apresentava alterações radiográficas consistentes com OCD. Esta observação sugere que a selecção dos gananhões por forma a minimizar as DOD, e em particular a OCD, deverá ser feita com base em testes de descendência em detrimento da avaliação radiográfica individual dos gananhões a seleccionar.

No caso do porco, pensa-se que a selecção genética para características como crescimento mais rápido, maior tamanho corporal e aumento de massa muscular, tenha contribuído fortemente para a elevada incidência de OCD nesta espécie (Done e Goody, 1995). Este pode também ter sido o caso dos cavalos Puro Sangue Inglês, onde frequentemente são os indivíduos maiores e de maturação mais precoce que comandam os preços mais elevados nas vendas ao ano de idade. Ao serem favorecidas estas características fenotípicas é possível, ainda que inadvertidamente, seleccionarem-se animais no sentido de uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de OCD (Aldred, 1998).

Todos os estudos realizados em cavalos indicam que a OC é transmitida como uma característica poligénica (Philipsson, 1996), tendo também sido obtidos

resultados semelhantes em cães (Padget *et al.* 1995). Não se sabe no entanto quais as características predisponentes ao desenvolvimento da doença nem sequer qual a natureza da interação existente entre os factores ambientais e genéticos.

Em todas as espécies estudadas existem dados que consubstanciam a importância da hereditariedade na etiologia da OC. Estes dados são no entanto respeitantes apenas a estudos focalizados em situações de OC *dissecans*, i.e., em fases avançadas da doença. É possível que em casos mais precoces, caso fosse possível identificá-los nessa fase, as associações sejam diferentes uma vez que seria mais improvável que pudessem ser complicadas pelos factores envolvidos na progressão da doença (Ytrehus *et al.*, 2007).

3.7.3 Características anatómicas

Grøndalen (1974d), nos seus trabalhos em porcos, sugeriu que uma má conformação articular pode causar uma pressão excessiva numa determinada localização sendo assim uma causa importante de OC *manifesta* e de OC *dissecans*. Também propôs que os critérios de selecção fossem baseados na forma e conformação externas das articulações. Alguns destes critérios foram implementados no sistema de criação de porcos na Noruega conduzindo a uma redução na incidência de lesões graves de OC *manifesta* nas articulações femorotibiais de 6,7% para 1,5% ao longo de um período de 10 anos entre 1970 e 1980 (Grøndalen, 1981).

As características anatómicas parecem constituir um importante factor etiológico de OC. No entanto, estas características estão indubitavelmente relacionadas, pelo menos até um certo limite, com os factores genéticos. Apesar disto é bastante difícil quantificar e saber até que ponto estas características estão ou não alteradas devido à progressão da doença (Ytrehus *et al.*, 2007).

3.7.4 Idade

No cavalo a natureza das lesões articulares também pode ser influenciada pela idade (Pool, 1996). Apesar do osso conservar a sua capacidade remodelativa ao longo de toda a vida do cavalo, o metabolismo cartilagíneo tem tendência a diminuir rapidamente no início da idade adulta. Desta forma é também possível constatar que o tempo necessário à remodelação cartilagínea nos adultos é bastante mais longo quando comparado com os animais jovens (Maroudas, 1980; Verzijl, 2000).

Tendo em conta estas observações é possível perceber que o período de remodelação da rede de colagénio que acontece numa fase precoce da vida dos animais é sem dúvida um período único, durante toda a vida do animal, cujas consequências podem ser extremamente significativas na prevenção do desenvolvimento de doenças osteoarticulares (Helminem *et al.*, 2000).

Há algumas lesões que por serem muito grandes ou por aparecerem tardiamente no período precoce da juventude não têm tempo para regredirem completamente durante esta fase de intenso metabolismo remodelativo (van Weeren, 2005).

Tendo em conta estas observações e o carácter precoce do aparecimento das lesões de OC, é nos animais mais jovens que se deverá centrar uma actuação preventiva no sentido de atenuar os efeitos nefastos da OC, quer em termos de bem-estar quer em termos económicos.

Importa no entanto não esquecer as observações de Dik *et al.* (1999) sobre a dinâmica de regeneração das lesões de OC entre o primeiro e o 11º meses de vida, as quais referem a possibilidade de regressão completa e espontânea das lesões nesta janela de susceptibilidade. Apenas lesões demasiado grandes podem não conseguir regredir completamente neste período permanecendo assim ao longo da vida do cavalo.

3.8 MÉTODOS DE MONITORIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE DISTÚRBIOS OSTEOARTICULARES, EM PARTICULAR A OSTEOCONDROSE

O método de eleição na identificação das lesões estabelecidas de OC é o diagnóstico radiográfico. Além de permitir identificar a grande maioria das lesões possibilita ainda um acompanhamento expedito e fidedigno da evolução das mesmas, seja em resposta a um tratamento instituído seja na avaliação da possibilidade de remissão espontânea. Apesar disto a radiologia convencional tem como principal desvantagem a grande insensibilidade no diagnóstico de situações precoces e pouco desenvolvidas, em especial se estas lesões afectarem principalmente a cartilagem (Billinghurst *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas tem sido possível observar um crescente interesse na pesquisa de técnicas não invasivas de monitorização do metabolismo ósseo (Jeffcott *et al.*, 1988). Estes métodos, usados correctamente, poderão facilitar a detecção dos cavalos em risco de desenvolverem problemas musculoesqueléticos antes que a dor e os sinais clínicos se tornem aparentes reduzindo assim o impacto económico destas perdas e evitando situações de sofrimento desnecessário.

3.8.1 Métodos imagiológicos

3.8.1.1 RADIOLOGIA CONVENCIONAL

A radiologia é o método de diagnóstico imagiológico mais utilizado actualmente para detectar lesões ósseas estabelecidas, podendo também ser usada para monitorizar a progressão da doença. No entanto, as radiografias não apresentam sensibilidade suficiente para detectarem alterações precoces, em especial na cartilagem (Billinghurst *et al.*, 2004).

3.8.1.2 CINTIGRAFIA

A cintigrafia, não sendo uma tecnologia imagiológica por definição, permite obter imagens da distribuição pelo osso e tecidos moles de compostos fosfatados radiomarcados previamente injectados no animal por via endovenosa. O radiofármaco mais comunmente utilizado nestes procedimentos é o Tecnécio-99m. Após a referida administração as emissões gama do radiofármaco são detectadas através de uma câmara própria para esse efeito (Seeherman, 1998) . É assim possível obter imagens gráficas de áreas de maior e mais intensa actividade metabólica.

A cintigrafia apresenta uma elevada sensibilidade mas uma baixa especificidade, não permitindo associar inequivocamente uma imagem a uma patologia em concreto.

Situações em que existe uma intensa actividade tecidual, como acontece em situações de distúrbios musculoesqueléticos, são facilmente identificáveis. A actividade de renovação mineral óssea é um destes exemplos (Seeherman, 1998). No entanto, e principalmente em animais jovens, as emissões de radiação gama que podem ser visíveis nas epífises dos ossos longos traduzem a actividade normal

própria do processo de crescimento nem sempre retractando, na maioria dos casos, distúrbios destas mesmas estruturas.

Apesar da sua alta sensibilidade, a cintigrafia não é uma ferramenta muito útil no diagnóstico de OC, uma vez que à excepção dos casos em que existe uma clara reactividade óssea associada ao processo, as alterações osteocondrais e os eventuais *flaps* cartilagíneos não são visíveis (Seeherman, 1998). Além deste aspecto, as implicações em termos de segurança radiológica e nuclear, requerem da parte dos operadores uma formação muito específica e exigem condições infra-estruturais cujo investimento apenas é justificável em unidade hospitalares de referência e na avaliação de casos muito específicos de claudicações subtis em animais de elevado rendimento desportivo.

3.8.1.3 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (TC) E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (RM)

Tanto a TC como a RM recorrem às mais avançadas tecnologias de imagiologia médica no diagnóstico de distúrbios com sede nos mais variados sistemas orgânicos, tanto em medicina humana como em medicina veterinária. São métodos de diagnóstico extremamente avançados mas, e principalmente no que à medicina equina dizem respeito, apresentam alguns factores limitativos incontornáveis. Se por um lado são tecnologias com custos muito elevados, por outro importa referir que apesar de teoricamente acessíveis apresentam limitações importantes no que respeita às áreas anatómicas passíveis de serem examinadas nos cavalos. Actualmente este tipo de exames apenas pode ser realizado nas extremidades distais dos membros (distalmente ao carpo ou ao tarso) e a cerca dos dois terços anteriores do pescoço. Estão actualmente em estudo alguns equipamentos alternativos que possam mais facilmente ser utilizados em cavalos ainda que algumas limitações anatómicas se possam manter inultrapassáveis.

Outro dos aspectos importantes a considerar na abordagem a estas técnicas tem a ver com a necessidade de submeter os animais a examinar a uma anestesia geral. Este facto condiciona obviamente todo o processo diagnóstico de rastreio que possa ser concebido uma vez que não é possível massificar o recurso a estes meios diagnósticos, quer devido aos elevados custos, quer devido aos riscos inerentes a um procedimento que implique o recurso a anestesia geral.

3.8.1.3.1 Tomografia Computadorizada

Esta tecnologia de diagnóstico utiliza os princípios da radiologia convencional no que respeita à obtenção de imagens médicas. A principal diferença prende-se com a tridimensionalidade que pode ser obtida através desta técnica uma vez que são obtidas imagens em corte sequencial das estruturas a examinar (Denoix e Audigié, 2004).

As principais vantagens deste método são: (i) a possibilidade de avaliar e acentuar as diferenças entre tecidos moles e o osso através das diferentes escalas de cinzentos na imagem; (ii) o facto de não haver sobreposição de estruturas permitindo inclusivamente observar o centro anatómico da grande maioria das estruturas orgânicas; (iii) a possibilidade de fazer a reconstrução tridimensional das áreas anatómicas examinadas obtendo uma excelente representação de ossos e articulações; e a capacidade de detectar diferenças de densidade no tecido ósseo (O'Callaghan, 1991; Martens *et al.*, 2000; Widmer *et al.*, 2000) permitindo avaliar situações de esclerose e/ou lise do osso subcondral (Hanson *et al.*, 1996; Denoix e Audigié, 2004) .

3.8.1.3.2 Ressonância Magnética

Tal como foi referido anteriormente, apresenta em termos globais as mesmas limitações da tomografia computadorizada. É no entanto uma técnica que permite obter informações únicas sobre a morfologia e a bioquímica da cartilagem (Denoix e Audigié, 2004). Certas sequências de imagem permitem realçar os fluidos orgânicos através do chamado efeito artrográfico, o qual é extremamente útil na identificação de lesões da cartilagem articular (Denoix e Audigié, 2004). Apresenta uma alta sensibilidade na avaliação de alterações de densidade do tecido ósseo tais como esclerose, lise, presença de quistos ou evidência de fracturas, sendo especialmente útil na avaliação do osso subcondral (Tapprest *et al.*, 2003). É ainda a única técnica de imagem que permite a detecção de lesões degenerativas da cartilagem articular numa fase precoce do seu desenvolvimento (Kneeland, 1997; McCauley e Disler, 1998; Sintzoff *et al.*, 1999).

3.8.2 Métodos bioquímicos

3.8.2.1 Avaliação de biomarcadores do metabolismo ósseo

Ao longo dos anos, muitos têm sido os investigadores que têm procurado identificar moléculas que possam servir como marcadores precoces de anomalias metabólicas em tecidos específicos, em particular no osso e na cartilagem.

Vários estudos têm evidenciado que as avaliações dos marcadores ósseos podem ser aplicadas ao estudo do metabolismo ósseo nos cavalos (Lepage *et al.*, 1990; Hank *et al.*, 1993; Davicco *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1995a e 1995b; Gray, 1996; Jackson *et al.*, 1996; Lepage *et al.*, 1997 e 1998, Black *et al.*, 1998).

Os marcadores ósseos não são mais que enzimas derivadas das células ósseas ou então são componentes da matriz óssea que são libertados na corrente sanguínea durante o processo de remodelação óssea (Price *et al.*, 1995a; Price, 1998) através da acção dos osteoblastos e/ou osteoclastos e permitem fornecer medidas concretas e instantâneas da actividade das células ósseas (Jackson *et al.*, 2003).

Apesar de traduzirem o balanço entre os processos de formação e reabsorção ósseas num determinado momento, não fornecem no entanto qualquer informação relativa à massa e à arquitectura do esqueleto em causa (Price, 1998).

A análise dos marcadores ósseos constitui um método não invasivo de detecção de animais em risco de desenvolverem distúrbios osteoarticulares. Ao serem utilizados como meio de diagnóstico precoce possibilitam a realização de procedimentos de carácter preventivo de forma a minimizar as consequências nefastas destes distúrbios, diminuindo a dor e o sofrimento dos animais afectados e evitando a sua reforma para a actividade desportiva (Harris e Gray, 1997).

Uma das principais dificuldades encontradas pelos investigadores prende-se com o limitado valor diagnóstico que pode ser atribuído à análise destes elementos uma vez que se por um lado não existem referências consistentes para valores considerados normais, por outro lado a sua especificidade em termos ósseos é em geral baixa (Rosal e Capen, 1997).

Estudos em seres humanos permitiram evidenciar que concentrações séricas de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, que traduzem a actividade

osteoclástica e osteoblástica num determinado momento, podem estabelecer um meio através do qual se possa estudar a resposta do osso a forças de carga específicas (Jackson *et al.*, 2003).

Desde que Jeffcott publicou nos finais dos anos 80 uma revisão sobre as potenciais aplicações dos métodos não invasivos de avaliação óssea em cavalos, têm vindo a ser feitos progressos significativos e desenvolvidas novas metodologias neste campo. Principalmente no uso de marcadores bioquímicos para avaliação da actividade metabólica óssea (Lepage *et al.*, 1990) e no recurso à ultrassonografia quantitativa para avaliar a densidade e robustez óssea (McCarthy *et al.*, 1990; Lepage *et al.*, 1998).

A taxa de renovação óssea em cavalos pode ser avaliada pela determinação na urina, soro ou plasma, das concentrações de marcadores bioquímicos específicos (Lepage *et al.*, 1990; Billinghamurst *et al.*, 2004), através de métodos de invasividade mínima (Billinghurst *et al.*, 2004).

Os marcadores bioquímicos permitem avaliar o processo de remodelação óssea seja durante processos de doença, tratamento ou treino, ou como resultado da fisiologia normal da renovação óssea. É no entanto importante frisar que actualmente não existe no mercado nenhum teste específico para qualquer marcador bioquímico, mensurável na urina ou no sangue, que possa por si só estabelecer com precisão um diagnóstico diferencial de doença metabólica óssea, ou dar uma noção precisa do estado de adaptação do tecido ósseo ao exercício físico em equinos (Lepage *et al.*, 2001).

A avaliação de marcadores séricos e urinários de formação e reabsorção óssea em cavalos é uma ferramenta muito útil na investigação do metabolismo ósseo e da respectiva resposta a alterações das suas propriedades mecânicas durante o processo de treino desportivo (Price *et al.*, 1995a; Lepage *et al.*, 2001).

Na avaliação da resposta do esqueleto às doenças sistémicas e às lesões, os testes de avaliação sérica e urinária dos biomarcadores ósseos constituem uma opção não invasiva alternativa ao recurso à biópsia óssea (Allen, 2003). Além disso, e também em contraste com a biópsia óssea, as medições repetidas e seriadas dos biomarcadores ósseos não interferem com o metabolismo ósseo (Frost, 1983).

Tal como foi anteriormente referido acerca das observações de Hurtig *et al.* (1996) e de Girard *et al.* (1997), seria possível reduzir a grande percentagem de cavalos retirados da competição devido a problemas esqueléticos se se conseguissem não só reconhecer e monitorizar as falhas precoces na resposta adaptativa do osso ao exercício físico, mas também antecipar e reconhecer o desenvolvimento de condições patológicas tais como a OC. Este objectivo talvez possa ser atingido através do uso de marcadores séricos bioquímicos como o telopeptídeo carboxiterminal de colagénio tipo I (ICTP) e a osteocalcina, tendo no entanto em conta que a idade é um parâmetro muito importante a considerar durante a avaliação clínica dos indivíduos (Hurtig *et al.*, 1991).

Nos animais jovens em geral, os biomarcadores ósseos apresentam em média concentrações séricas mais elevadas devido à elevada taxa de renovação óssea existente durante o crescimento ósseo (Rosal e Capen, 1997). À medida que os animais crescem observa-se uma clara tendência para a diminuição dos níveis séricos dos biomarcadores ósseos. Este facto revela uma tendência para o decréscimo da actividade relacionada com o processo de renovação óssea traduzindo o aumento de maturidade esquelética característico da progressão etária (Price, 1998). Daqui se pode inferir que há uma clara dependência entre os valores séricos dos biomarcadores ósseos e a idade dos indivíduos analisados.

A avaliação e o estudo da cartilagem osteocondrótica em cavalos permitiu identificar alterações importantes na distribuição da matriz extracelular, tanto de osso como de cartilagem, bem como nos níveis das respectivas enzimas degradativas. Estes dados têm tido especial interesse tanto para clínicos como para investigadores uma vez que permitem uma monitorização não invasiva deste processo patológico através da avaliação de alterações mensuráveis em alguns fluidos corporais (sangue, urina e líquido sinovial) (Lepage *et al.*, 1990; Billinghamurst *et al.*, 2004). É cada vez mais evidente que as alterações que podem surgir no metabolismo do colagénio desempenham um papel fundamental no mecanismo molecular da OC. No entanto, a questão principal que permanece por responder é se estes eventos são primários ou secundários ao processo de desenvolvimento da OC (Ytrehus *et al.*, 2007).

Um estudo muito interessante conduzido por Billinghamurst *et al.* (2004) colocou como hipótese que talvez a severidade das lesões de OC, identificadas macroscopicamente quer por radiografia quer em exame *post mortem*, estivessem correlacionadas com as respectivas concentrações séricas de biomarcadores

específicos do metabolismo ósseo e cartilágneo, podendo deste modo funcionar como elementos identificativos precoces do desenvolvimento da doença. Neste estudo pôde concluir-se que em poldros mais velhos, com lesões permanentes, a severidade das lesões de OC observadas estava significativamente relacionada com as concentrações séricas de biomarcadores indicativos de diminuição de formação óssea, nomeadamente a osteocalcina e o peptídeo carboxiterminal do procolagénio tipo I (PICP), bem como daqueles de síntese de cartilagem, neste caso o ICTP.

Nos cavalos têm sido usados os seguintes marcadores ósseos séricos ou plasmáticos: osteocalcina (OC), peptídeo carboxiterminal do procolagénio tipo I (PICP), fosfatase alcalina de especificidade óssea (FAO), deoxipiridinolina total (TD-Pyr), telopeptídeo carboxiterminal de colagénio tipo I (ICTP) e o telopeptídeo de colagénio tipo I (CTx) (Lepage *et al.*, 2001). Também Price *et al.* (1995b) haviam já considerado como biomarcadores apropriados para cavalos a FAO, a osteocalcina e o ICTP.

Em cavalos, os marcadores ósseos tais como a osteocalcina, o PICP e a FAO reflectem a formação de matriz óssea enquanto que a TD-Pyr, o ICTP e o CTx são utilizados como marcadores de degradação da matriz óssea (Price *et al.*, 1995b; Lepage *et al.*, 2001).

Na altura da realização deste estudo, e segundo a revisão de Allen (2003), os marcadores ósseos validados para equinos incluíam entre outros o PICP, o ICTP, FAO e a osteocalcina (tabelas 1 e 2). Por este facto, e na sequência desta revisão bibliográfica apenas se procuraram avaliar os marcadores que, estando validados para equinos, tinham um “kit” diagnóstico disponível no mercado.

3.8.2.2 BIOMARCADORES DE FORMAÇÃO ÓSSEA

3.8.2.2.1 Osteocalcina

A osteocalcina é uma proteína que contém ácido γ -carbiglutâmico sendo também designada na literatura anglo-saxónica por *bone gla-protein*. Sendo dependente da vitamina K é a proteína não colagénica mais abundante do osso. Tem propriedades fixadoras do cálcio estando correlacionada com a formação óssea. É produzida pelos osteoblastos e pelos odontoblastos durante a fase de mineralização da matriz óssea (Ristelli e Ristelli, 1993; Harris, 1997; Rosal e Capen, 1997). Em

humanos constitui cerca de 1 a 2% do osso adulto (Harris, 1997). Alguns valores de referência apontam para concentrações séricas de $47 \pm 10,1$ ng/ml em cavalos com menos de 12 meses, e de 36 ± 14 ng/ml em animais mais velhos (Harris, 1997).

A osteocalcina é considerada o mais útil marcador em termos de formação óssea. No entanto, é uma molécula com uma semi-vida sérica bastante curta o que implica alguns cuidados na obtenção e preparação de amostras para diagnóstico (Rosal e Capen, 1997) principalmente se são esperadas variações muito pequenas das respectivas concentrações séricas (Lepage *et al.*, 1991).

Em 1995, Delmas desenvolveu uma técnica de radioimunoensaio que permitiu avaliar a osteocalcina. A osteocalcina tem vindo a ser universalmente utilizada como marcador de formação óssea (Ducy *et al.*, 1996). Como não é libertada do osso durante o processo de reabsorção sendo apenas libertada durante a formação óssea, os níveis séricos de osteocalcina reflectem de forma precisa a actividade de síntese osteoblástica (Price, 1998).

Existe uma estreita correlação entre os níveis séricos de osteocalcina e as taxas de formação óssea medidas por histomorfometria óssea (Eastell *et al.*, 1988) e também entre concentrações séricas de osteocalcina e as de outros biomarcadores séricos de formação óssea (Joffe *et al.*, 1994).

Os níveis séricos de osteocalcina estão geralmente elevados em pacientes com OA. Este facto consubstancia a observação de que nas OA o processo activo predominante é o de deposição óssea, sendo possível corroborar este facto através da identificação radiográfica da esclerose óssea resultante (Poole, 1996). Contudo, Girard *et al.* (1997) observaram valores de osteocalcina cerca de duas vezes inferiores ao normal num poldro com OC vertebral.

Lepage *et al.* (1990 e 1997) referiram a existência de uma correlação inversa entre os valores de osteocalcina observados nos seus estudos e as idades dos animais, as quais estavam compreendidas entre o nascimento e os 20 anos de idade. Esta observação tem vindo a ser interpretada como indicadora de uma diminuição da taxa de formação óssea em cavalos adultos quando comparada com os poldros.

Lepage *et al.* (1992), demonstraram que nos cavalos não parece existir uma influência significativa do sexo na concentração sérica de osteocalcina. Noutro

trabalho destes mesmos investigadores (1990) foi também possível constatar a existência de uma correlação inversa significativa entre este biomarcador e a idade dos indivíduos em estudo.

Jackson *et al.* (2003) observaram também que há uma crescente evidência de que os marcadores ósseos, em particular as concentrações séricas de osteocalcina, são influenciados pelo exercício em cavalos. De uma forma geral, os níveis séricos de ICTP e osteocalcina revelaram-se significativamente inferiores em animais exercitados num tapete rolante durante um determinado período de tempo quando comparados com animais num grupo controlo.

Em casos de discondroplasia generalizada e epifisiolise vertebral, a concentração sérica de osteocalcina é cerca de 50% inferior ao valor médio observado em indivíduos sãos com a mesma idade (Girard *et al.*, 1997), indiciando assim níveis subnormais de deposição óssea.

McIlwraith *et al.* (2001), baseados em trabalhos realizados no seu laboratório no Colorado, afirmaram no entanto que parece não existirem dados concretos da utilidade da osteocalcina na detecção precoce de alterações do osso subcondral em animais exercitados.

3.8.2.2 Fosfatase Alcalina de Especificidade Óssea (FAO)

A FAO é uma isoenzima da fosfatase alcalina. Sendo uma proteína ligada às membranas, a FAO encontra-se nas membranas celulares dos osteoclastos. É libertada durante o processo de formação óssea através de um mecanismo que ainda permanece desconhecido (Rosal e Capen, 1997). Está também ela associada à mineralização óssea (Harris, 1997). É considerada como sendo o biomarcador ósseo mais preciso na avaliação da formação óssea estando particularmente indicada em caso de aumento de actividade osteoblástica como sucede na doença de Paget em humanos (Deftos *et al.*, 1991).

Segundo Harris (1997), as concentrações séricas de FAO aumentam em fases activas do metabolismo ósseo principalmente no que respeita à deposição/formação de osso. Estas concentrações tendem a diminuir à medida que o animal atinge o estado adulto e a maturidade esquelética.

Estudos realizados abordando em paralelo a FAO e o PICP evidenciaram que ambos sofrem um aumento das concentrações séricas em resposta ao exercício físico (Harris, 1997).

Hank *et al.* (1993) relataram também a existência de uma correlação inversa entre os níveis de FAO e a idade dos cavalos. Price *et al.* (1995a) observaram ainda que a diminuição dos níveis de FAO e PICP reflecte o decréscimo relacionado com a progressão da idade sobre estes marcadores de formação óssea reflectindo assim um decréscimo desta mesma formação óssea. Este decréscimo revelou-se mais gradual, logo menos abrupto, em animais sujeitos a exercício físico.

Em cavalos exercitados é observada uma correlação positiva entre o PICP e o aumento sérico transitório de FAO reflectindo uma aumento na taxa de renovação óssea (Price *et al.*, 1995a).

Por outro lado McIlwraith *et al.* (2001) evidenciaram a existência de uma correlação positiva significativa entre os níveis de FAO e a existência de lesões cartilagíneas avaliadas artroscopicamente, o que permite imputar ao metabolismo ósseo subcondral um papel putativo no desenvolvimento de situações de OA.

3.8.2.2.3 Propeptídeo Carboxiterminal de Procolagénio Tipo I (PICP)

O PICP corresponde a uma das porções terminais da molécula de procolagénio libertado na corrente sanguínea durante a síntese de colagénio tipo I, a porção carboxiterminal. É uma proteína globular trimérica libertada pela clivagem das pontes carboxi-dissulfito no momento em que as moléculas de colagénio vão formar as fibras de colagénio (Harris e Gray, 1997; Rosal e Capen, 1997). Constitui cerca de 97% do colagénio do osso e é também uma molécula com uma curta semi-vida. É sintetizado como procolagénio pelos osteoblastos durante o processo de formação óssea (Rosal e Capen, 1997).

No entanto, o PICP não é inteiramente específico do tecido ósseo uma vez que o colagénio tipo I pode ser encontrado noutros tecidos que não o osso. No caso dos cavalos Puro Sangue Inglês em crescimento existe uma grande contribuição de outros tecidos somáticos para os níveis séricos de PICP (Price *et al.*, 1997).

A concentração sérica de PICP é afectada pelo ritmo metabólico do osso. Reflecte a formação e renovação óssea em processos como o crescimento mas também em situações de doença (Harris e Gray, 1997).

Harris e Gray (1997) escreveram ainda que os valores séricos de PICP também seriam condicionados pela idade numa relação inversa. Estes autores sugerem ainda que aos 5 anos de idade, aproximadamente, se verifica uma estabilização destes valores de PICP.

Em seres humanos já foi possível demonstrar em várias situações a existência de uma relação significativa entre os níveis sanguíneos de PICP e a taxa de formação óssea (Parfitt, *et al.*, 1987; Melkko *et al.*, 1990). Outros estudos descrevem também a utilidade deste peptídeo como marcador bioquímico de formação óssea ao longo do crescimento normal bem como em diversas doenças que evoluem com alteração do metabolismo ósseo (Carey *et al.*, 1985; Trivedi *et al.*, 1991; Eriksen *et al.*, 1993).

Em pessoas consideradas livres de problemas ósseos, as concentrações séricas variam consoante a idade. Durante os três primeiros meses de vida os níveis são elevados, diminuindo progressivamente até cerca dos 4 anos de idade, período em que se observa uma relação negativa entre os níveis de PICP e a idade, peso e altura. A partir de então os níveis mantêm-se estáveis, sem modificação durante a puberdade, mas superiores aos níveis dos adultos (Trivedi *et al.*, 1991; Hertel *et al.*, 1993). Foi também possível constatar que a presença de problemas do metabolismo ósseo, caracterizados por uma elevada actividade osteoblástica em indivíduos adultos, se traduzia na presença de elevados níveis séricos de PICP (Coen *et al.*, 1992; Ebeling *et al.*, 1992).

O PICP tem sido avaliado em vários estudos realizados em cavalos que têm evidenciado um decréscimo significativo dos seus níveis séricos à medida que se verifica o aumento da idade, bem como quando existe um aumento do exercício. Isto quando comparados com animais controlo não sujeitos a exercício físico (Price *et al.*, 1995a e 1995b; Mathiason-Kochan *et al.*, 2001)

Além de ser um marcador do metabolismo ósseo o PICP também pode ser útil como indicador do crescimento longitudinal, podendo ser utilizado na monitorização da recuperação do crescimento. Por outro lado convém lembrar que estes marcadores procedem de diferentes fases do processo de formação óssea e que assim sendo as

alterações nos seus níveis séricos podem depender de mecanismos diferentes, tal como acontece nos mecanismos próprios da fisiopatologia de cada doença.

3.8.2.2.4 Propeptídeo Aminoterminal de Procolagénio Tipo I (PINP)

O PINP corresponde à outra porção terminal da molécula de procolagénio, libertado na corrente sanguínea durante a síntese de colagénio tipo I. Corresponde à porção aminoterminal. Apresentando as mesmas características do PICP este marcador é libertado na corrente sanguínea durante o processo de síntese de matriz óssea. Deste modo, estudos comparativos entre estes dois biomarcadores revelam que os níveis de PINP apresentam uma boa correlação com os níveis de PICP (Linkhart *et al.*, 1993). Este marcador seria de especial relevância na avaliação da função osteoblástica em pacientes com hiper ou hipotiroidismo (Risteli e Risteli, 1994) uma vez que o seu metabolismo não é influenciado pelas hormonas tiroideias.

Alguns trabalhos sugeriram inclusivamente que a verificação de valores séricos elevados de PINP indicava uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de distúrbios osteoarticulares (Harris, 1997).

Este marcador não está no entanto validado para cavalos pois não apresenta reactividade cruzada para a espécie equina (Tabela 1). Apesar disso foi considerado no âmbito deste trabalho.

3.8.2.3 BIOMARCADORES DE REABSORÇÃO ÓSSEA

3.8.2.3.1 Telopectídeo Carboxiterminal de Colagénio Tipo I (ICTP)

No tecido ósseo, as moléculas de colagénio estão unidas por três resíduos do aminoácido hidroxilisina, lisina ou seus derivados. Deste modo, cada duas moléculas de colagénio estão unidas entre si por uma estrutura cíclica chamada piridinolina. Os telopeptídeos (extremidades da cadeia proteica) carboxiterminal e aminoterminal do colagénio tipo I, cujas cadeias proteicas estão unidas entre si através da referida estrutura piridinolínica, são libertados durante a degradação do colagénio tipo I (Risteli *et al.*, 1993), dando origem aos telopeptídeos carboxiterminal (ICTP) e aminoterminal do colagénio tipo I (INTP). Estas substâncias são posteriormente libertadas na circulação sanguínea e excretadas através da urina.

Estudos efectuados *in vivo* e *in vitro* em humanos demonstraram que existe uma correlação significativa entre os níveis séricos do ICTP e a taxa de degradação da matriz óssea avaliada por métodos histomorfométricos (Ljunggren e Ljunghal, 1992; Eriksen *et al.*, 1993). É possível observarem-se níveis elevados de ICTP em condições em que se verifique um aumento da reabsorção óssea.

Convém no entanto lembrar que os valores normais destes marcadores variam consoante a idade, sendo tanto maiores quanto mais jovens forem os indivíduos em estudo. Isto deve-se ao crescimento longitudinal do esqueleto característico das fases mais jovens da vida, o que proporciona um metabolismo ósseo mais activo nessas idades. Portanto, é necessário algum cuidado na interpretação de resultados relativos a este marcador uma vez que os valores de referência não são os mesmos para todas as idades.

As cadeias das moléculas de procolagénio são inicialmente sintetizadas com extensões terminais amino (N) e carboxilo (C) . Durante a formação das fibrilhas extracelulares decorre um processo de remoção proteolítica destes propeptídeos das moléculas de procolagénio. Na sequência deste processo, estes propeptídeos podem ser detectados em tecidos e fluidos corporais como marcadores biológicos da síntese de colagénio.

Price *et al.* (1995a) verificaram que os valores de referência obtidos para concentrações séricas de ICTP em cavalos de tiro e *warmbloods* de 4 anos e entre 5 e 14 anos são semelhantes aos descritos para os Puro Sangue Inglês. Estes investigadores relataram ainda que as alterações mais significativas nos valores séricos de ICTP em cavalos Puro Sangue Inglês acontecem durante os primeiros cinco anos de vida (Price *et al.*, 1995a).

Lepage *et al.* (1997) vieram também reforçar as conclusões destes resultados que indicavam que os níveis séricos de osteocalcina e de ICTP eram também eles diferentes entre cavalos de tiro e *warmbloods*.

As concentrações de ICTP são significativamente mais elevadas em cavalos com doenças do desenvolvimento ortopédico (Price *et al.*, 1997). Por outro lado, a tendência natural para se observarem níveis séricos crescentes de ICTP em animais com idades compreendidas entre os 11 e os 14 anos, pode reflectir apenas uma maior

predisposição para o desenvolvimento de problemas esqueléticos à medida que a idade dos animais avança.

As medições das concentrações séricas de ICTP e osteocalcina nos cavalos têm sido realizadas com recurso a radioimunoensaios, os quais têm evidenciado uma reactividade cruzada com o ICTP equino (Price *et al.*, 1995a) e com a osteocalcina equina (Patterson-Allen *et al.*, 1982) respectivamente.

Há no entanto dados que poderão fazer duvidar da especificidade e da sensibilidade do ICTP enquanto marcador de reabsorção óssea. O colagénio tipo I encontra-se maioritariamente no osso (Harris, 1997), embora também possa ser encontrado em outros tecidos que não o osso (Uebelhart e Delmas, 1993). Além disso, a falta de correlação observada entre o ICTP e os elementos entrecruzados de piridinolina, um marcador de reabsorção óssea universalmente aceite em humanos (Uebelhart *et al.*, 1990), parece sugerir que o ICTP não poderá ser considerado como um marcador específico de reabsorção óssea nesta espécie, podendo o mesmo suceder nos cavalos.

Krabbe *et al.* (1980) e Trivedi *et al.* (1991) evidenciaram a existência de uma correlação significativa entre a idade e os valores séricos de ICTP, de PICP e de FAO em cavalos, sendo estes últimos dois marcadores séricos os que traduzem formação óssea. Apesar disto, Price *et al.* (1995a), não conseguiram verificar que esta correlação, nomeadamente com a FAO, fosse evidente e significativa em animais com idades superiores a 12 meses.

Em 2005, Carstanjen *et al.* consideraram a osteocalcina sérica e o ICTP como marcadores ósseos promissores para monitorizar as alterações induzidas pelo exercício no metabolismo ósseo em cavalos.

A FAO e o PICP, dois marcadores séricos que traduzem formação óssea (Krabbe *et al.*, 1980; Trivedi *et al.*, 1991) também evidenciam um padrão de alterações semelhantes ao ICTP em cavalos, o que parece indicar semelhanças na tradução do ritmo de renovação óssea em cavalos em diferentes idades quando avaliados estes marcadores (Price *et al.*, 1995a).

O sexo dos animais não influencia as concentrações séricas de osteocalcina e de ICTP em cavalos de tiro ou em *warmbloods* (Lepage *et al.*, 1997). Estes resultados

foram uma vez mais corroborados através de estudos realizados em fêmeas e machos standardbred (Lepage *et al.*, 1992). Isto significa que, ao contrário do que acontece em humanos (Epstein *et al.*, 1984), o factor sexo provavelmente não necessita de ser tido em conta aquando da avaliação dos valores de marcadores ósseos a estudar (Lepage *et al.*, 2001).

As baixas concentrações séricas de osteocalcina e as concentrações superiores de ICTP em cavalos de tiro, quando comparadas com os *warmbloods* podem indicar uma diferença na remodelação da massa óssea ou do osso basal entre estes dois tipos de cavalos, as quais estarão provavelmente relacionadas com diferenças morfológicas e fisiológicas de carácter hereditário (Lepage *et al.*, 2001).

No cavalo os níveis de ICTP já foram analisados no que diz respeito a diferenças de idade, tipos de exercício e tipos de raça, não tendo no entanto sido possível em nenhum destes estudos demonstrar a sua utilidade no diagnóstico e na identificação de processos patológicos (Price *et al.*, 1995a; Jackson *et al.*, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

Este estudo foi efectuado entre os meses de Julho e Agosto de 2007 numa população de 50 cavalos inteiros (não castrados) de raça Puro Sangue Lusitano, com idades compreendidas entre os 5 e os 17 anos. Em termos morfométricos a população era relativamente uniforme considerando um peso vivo médio estimado de 500 kg por animal e uma altura ao garrote consistente com os padrões do livro genealógico da raça (média=158 cm).

Com o objectivo de determinar a influência da idade nos parâmetros avaliados, os cavalos foram distribuídos por dois grupos etários. Assim sendo, um grupo englobou os animais com idade inferior a 10 anos ($n = 26$) e que foi designado de **Grupo A** e outro que incluiu os animais com idade superior a 10 anos ($n = 24$) designado de **Grupo B**.

4.2 MANEIO GERAL DA POPULAÇÃO DURANTE O ESTUDO

Os animais do estudo foram mantidos no mesmo espaço físico estando todos sujeitos a um mesmo tipo de manejo diário, excepção feita aos níveis de trabalho a que estavam submetidos. Durante a maior parte do tempo os cavalos estavam confinados em boxes individuais saindo apenas para efectuarem o seu trabalho diário.

No processo de delineamento experimental não foi considerada qualquer alteração de manejo, quer de trabalho quer alimentar, por limitações que envolviam a realização do estudo na amostra em causa. No entanto, e apesar de não ter sido efectuado nenhum condicionamento do trabalho a que estavam sujeitos, foi possível constituir dois grupos de estudo sujeitos a dois regimes de exercício distintos como será posteriormente referido neste trabalho.

4.2.1 ALIMENTAÇÃO

O regime alimentar a que estavam sujeitos todos os animais na altura em que foi efectuado o estudo, não sofreu qualquer alteração para efeitos de delineamento experimental. Ainda que seja reconhecida a importância deste factor no desenvolvimento de alguns distúrbios osteoarticulares em geral e na osteocondrose em particular, neste estudo apenas se assegurou que todos os animais estivessem sob as mesmas condições de aporte nutricional. A todos os animais estavam a ser

fornecidos aproximadamente dois quilos e meio de um alimento concentrado de preparação comercial (Tabela 1) suplementados com a mesma quantidade de aveia em grão (aproximadamente dois quilos e meio) e posteriormente divididos em duas refeições diárias. Além do alimento concentrado de formulação comercial e da aveia eram-lhes também fornecidos diariamente cerca de 8 a 10 kg de palha de trigo. A água estava disponível *ad libitum*.

Tabela 1 - Composição do alimento concentrado comercial fornecido aos animais da população em estudo

| Proteína Bruta | Gordura Bruta | Celulose Bruta | Cinza Total | Cinza Insolúvel | Vitamina A | Vitamina D3 | Vitamina E | Cobre |
|----------------|---------------|----------------|-------------|-----------------|--------------|-------------|------------|---------|
| 14,0 % | 3,8 % | 12,5 % | 9,5 % | 2,8 % | 10.000 UI/kg | 1.500 UI/kg | 20 mg/kg | 5 mg/kg |

4.2.2 REGIME DE EXERCÍCIO FÍSICO

Sendo um dos factores mais importantes em avaliação neste trabalho, foi então considerada a separação dos animais em estudo em dois grupos sujeitos a programas de exercício distintos. Esta separação não foi condicionada pela investigação uma vez que estes dois grupos já estavam constituídos na organização geral do trabalho equestre desta escola. Este facto explica também a diferença no número de animais presente em cada grupo. Também não foi possível constituir um grupo controlo que não estivesse sujeito a qualquer tipo de exercício devido às contingências existentes e já referidas.

Um dos grupos (Grupo T) foi submetido a um programa de exercício diário de cerca de 45 minutos. Este programa englobava um período de 15 minutos de trabalho à guia nos diferentes andamentos: passo, trote e galope, seguido de 30 minutos de trabalho montado.

Entenda-se por trabalho à guia o trabalho efectuado pelo cavalo sujeito por uma rédea-guia de comprimento variável, presa a um cabeção, e que permite ao cavalo movimentar-se em círculos com raio variável mas aproximado em média dos cinco metros, nos diferentes andamentos pretendidos, passo, trote e galope. Trabalho montado é aquele que subentende a presença de um cavaleiro montado em cima do cavalo, na respectiva sela, durante a realização dos diferentes exercícios e que, pela arte da equitação, condiciona os respectivos andamentos do cavalo. À guia o trabalho

é essencialmente desenvolvido a trote sendo que montado é desenvolvido nos três andamentos principais da equitação, passo, trote e galope.

Este primeiro grupo englobava 62% dos animais em estudo (n=31). Os restantes 38% (n=19) constituíam o outro grupo (Grupo D).

O segundo grupo de cavalos em estudo desenvolvia um regime de trabalho menos intenso e que implicava apenas cerca de 30 minutos diários de trabalho à guia. Nenhum dos animais desenvolvia outro tipo de exercício não condicionado, entenda-se exercício livre, soltos em padoque. Quando não estavam em trabalho permaneciam estabulados.

Uma vez que o factor idade havia sido previamente considerado na separação base de dois grupos etários, e procedendo à posterior separação existente pelos grupos de exercício, foi possível caracterizar a população da forma que a seguir se retracta na Tabela 2.

| | | A | | B | | Total | |
|------------------|----------------|-----------|----|-----------|----|--------------|-----|
| <i>Idade</i> | | < 10 anos | | > 10 anos | | | |
| | | n | % | n | % | n | % |
| <i>Exercício</i> | Grupo T | 14 | 28 | 17 | 34 | 31 | 62 |
| | Grupo D | 12 | 24 | 7 | 14 | 19 | 38 |
| <i>Totais</i> | | 26 | 52 | 24 | 48 | 50 | 100 |

Tabela 2 – Distribuição dos animais pelos diferentes grupos etários e pelos diferentes grupos de exercício (Grupo T - 45 minutos exercício; Grupo D - 30 minutos exercício)

4.3 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Todos os animais em estudo foram sujeitos a um exame radiográfico sumário das articulações metacarpofalângicas direita e esquerda (MclIPI-dt e MclIPI-esq) e metatarsofalângicas direita e esquerda (MtlIPI-dt e MtlIPI-esq), bem como do conjunto das articulações do tarso constituído pelas articulações tarsocrural (TCr), intertársicas proximal (ITP) e distal (ITD) e tarsometatársicas (TMtIII) direita e esquerda(-dt, -esq). Foi utilizado um gerador de raios-X portátil da marca Soyee 100Kvp® gentilmente cedido pela empresa Piclusa. Nenhum dos animais em estudo foi sujeito a sedação para a realização dos exames radiográficos.

Os estudos de rastreio radiográfico realizados para avaliar os níveis de OC nas articulações tarsocrurais e femoropatelaes realizados por van Weeren (1999) incluíram as projecções latero-medial (LM), dorso-plantar (DPI) e dorsomedial-plantarolateral oblíqua (DMPILO) para as tarsocrurais e LM e caudolateral-craniomedial oblíqua (CdLCrMO) para as femoropatelaes.

Nesta avaliação foram utilizadas a projecção latero-medial (LM) para as articulações McIIIPI e MtIIIPI e as projecções LM, DPI (dorso-plantar) e DLPIMO (dorsolateral-plantaromedial oblíqua) para as articulações do tarso. Tendo em conta as especificações do gerador de raios-X foram realizadas exposições a 80 cm de distância focal utilizando constantes radiográficas fixas a 70 Kv * 25 mA variando apenas os tempos de exposição entre os 0,2 e os 0,3 segundos.

Após esta avaliação, e tendo em conta a identificação das eventuais lesões de OC, foi possível considerar dois grupos de estudo para posterior enquadramento na avaliação sérica dos biomarcadores ósseos. Um grupo incluiu os animais livres de lesões de OC que constituiu o grupo controlo (**Grupo Controlo**) e outro com os animais que apresentavam quaisquer evidências de OC nas articulações examinadas (**Grupo OC**).

4.4 RECOLHA DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Foi realizada uma colheita de sangue a todos os animais em estudo por venipunctura jugular. As amostras foram recolhidas entre as 08.00 e as 09.00 horas da manhã do mesmo dia e colocadas directamente em tubos de 10 ml de volume com esferas activadoras da coagulação (Monovette-Sarstedt).

Estudos em humanos concluíram que o factor mais importante de variabilidade pré-analítica na avaliação da actividade celular óssea através de biomarcadores bioquímicos se deve à existência de alterações circadianas. Apesar de ainda não ser claro que, nos cavalos, este ritmo circadiano possa influenciar as concentrações dos biomarcadores ósseos, é aconselhável que seja seguida alguma consistência na recolha de amostras de forma a evitar estas possíveis condicionantes (Jackson *et al.*, 2003).

As amostras de sangue foram transportadas para o laboratório a 4°C logo após a colheita. No espaço de duas horas após esta mesma colheita, todas as amostras foram centrifugadas a 1230 g, durante cerca de 15 minutos. O soro resultante foi recolhido por pipetagem para tubos “*ependorf*” de 1,5 ml previamente identificados e posteriormente armazenado a -20°C até à realização dos ensaios laboratoriais de determinação dos diferentes biomarcadores ósseos seleccionados.

4.5 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DOS BIOMARCADORES ÓSSEOS

A avaliação laboratorial dos biomarcadores ósseos foi realizada cerca de 10 dias após a colheita. Para a avaliação dos biomarcadores seleccionados foram utilizados os seguintes testes comerciais de laboratório, respeitando as referências da bibliografia condicionados apenas pela respectiva disponibilidade comercial: marcadores de formação óssea – **osteocalcina** (Metra[®] Osteocalcin, Quidel Corporation), **FAO** (Metra[®] BAP, Quidel Corporation) e **PINP** (UniQ[®] PINP RIA, Orion Diagnostics); marcador de reabsorção óssea – **ICTP** (UniQ[®] ICTP RIA, Orion Diagnostics). Os procedimentos para a avaliação da osteocalcina em cavalos por EIA foram já previamente validados (Patterson-Allen *et al.*, 1982; Lepage *et al.*, 1990; Hiney *et al.*, 2000; Lepage *et al.*, 2001) bem como os de PICP e ICTP por RIA (Price *et al.*, 1995a; Price *et al.*, 1995b; Hiney *et al.*, 2000; Lepage *et al.*, 2001). Allen (2003) publicou um trabalho sobre os usos e as limitações dos biomarcadores ósseos em animais no qual fez referência aos dados de reactividade cruzada em testes comerciais de avaliação de biomarcadores de formação e reabsorção ósseas (tabelas 3 e 4).

4.5.1.1 OSTEOCALCINA

Na avaliação das concentrações de osteocalcina foi utilizado um imunoensaio (EIA) Metra[®] Osteocalcin da empresa QUIDEL. Trata-se de um imunoensaio competitivo em que são utilizadas tiras revestidas de osteocalcina, um anticorpo anti-osteocalcina de rato, um conjugado com fosfatase alcalina (IgG) anti-rato e um substrato de p-nitrofenilfosfato (pNPP) para quantificar a osteocalcina no soro.

Tabela 3 – Dados de reactividade cruzada para testes comerciais de avaliação sérica de biomarcadores de formação óssea (Adaptado de Allen, 2003)

| Biomarcador | Teste (Kit comercial) | Reactividade Cruzada |
|--|--------------------------------|----------------------|
| | | Cavalo |
| Fosfatase Alcalina de Especificidade Óssea | Metra BAP ^α | S |
| | Tandem-R-Ostase ^β | S |
| Osteocalcina | Metra Osteocalcin ^α | S |
| | Osteocalcin ^γ | S |
| Propeptídeos do Colagénio | Metra CACP ^α | N |
| | PICP ^γ | S |
| | PINP ^γ | N |

S - indica que a reactividade cruzada já foi validada

N - indica que não existe reactividade cruzada

α - Quidel Corporation (San Diego, CA, <http://www.quidel.com>).

β - Beckman Coulter (Brea, CA, <http://www.beckman.com>).

γ - DiaSorin Inc (Stillwater, MN, <http://www.diasorin.com>). PICP – propeptídeo carboxiterminal; PINP – propeptídeo aminoterminal

Tabela 4 – Dados de reactividade cruzada para testes comerciais de avaliação sérica (S) e urinária (U) de biomarcadores de reabsorção óssea (Adaptado de Allen, 2003)

| Biomarcador | Teste (Kit comercial) | Reactividade Cruzada |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------|
| | | Cavalo |
| Telopectídeos do Colagénio | Serum ICTP (S) ^β | S |
| | Osteomark (U) ^γ | ? |
| | Serum Osteomark (S) ^γ | ? |
| | CrossLaps (U) ^θ | ? |
| | Serum CrossLaps (S) ^θ | S |

S - indica que a reactividade cruzada já foi validada

? - indica que não existem dados disponíveis

β - DiaSorin Inc (Stillwater, MN, <http://www.diasorin.com>). ICTP – telopeptídeo carboxiterminal entrecruzado de colagénio tipo I

γ - Ostex International Inc (Seattle, WA, <http://www.ostex.com>)

θ - Nordic Bioscience A/S (Herlev, Denmark, <http://www.nbdiagnostics.com>)

4.5.1.2 FOSFATASE ALCALINA DE ESPECIFICIDADE ÓSSEA (FAO)

O teste utilizado nesta determinação, também da empresa QUIDEL, foi o Metra[®] BAP. Este é um imunoensaio que utiliza um formato de tira de microtitulação e que utiliza um anticorpo monoclonal anti-FAO revestindo a tira dos poços para captar FAO da amostra. A actividade enzimática da FAO captada é detectada com um substrato de p-nitrofenilfosfato (pNPP).

4.5.1.3 PROPEPTÍDEO AMINOTERMINAL DE PROCOLAGÉNIO TIPO-I (PINP)

Para a determinação deste marcador foi utilizado um “kit” de radioimunoensaio fabricado pela empresa Orion Diagnostica, com a designação comercial UniQ[®] PINP RIA. Este teste baseia-se numa técnica de radioimunoensaio competitivo. Uma quantidade conhecida de PINP marcado e uma quantidade desconhecida de PINP não marcado numa amostra competem por um número limitado de locais de ligação de alta afinidade de anticorpos policlonais anti-PINP de coelho. Um segundo anticorpo direccionado à IgG de coelho e revestido por partículas de caulino é usado para separar as fracções de PINP livre da fracção de PINP ligada aos anticorpos. A radioactividade do antigénio marcado ligado foi medida através de um contador gama automático, neste caso em concreto utilizou-se o modelo 1470 Wizard[™] da Wallac. As concentrações das amostras em teste foram obtidas através da curva de calibração que foi desenhada utilizando os valores obtidos através da avaliação dos calibradores presentes no teste cujas concentrações são conhecidas e que variam entre 0 e 250 µg/l de PINP.

4.5.1.4 TELOPEPTÍDEO CARBOXITERMINAL DE COLAGÉNIO TIPO-I (ICTP)

Do mesmo modo que para o PINP, para a determinação do marcador ICTP, foi utilizado um “kit” de radioimunoensaio fabricado pela empresa, Orion Diagnostica, com a designação comercial UniQ[®] ICTP RIA. Este teste baseia-se numa técnica de radioimunoensaio competitivo. Uma quantidade conhecida de ICTP marcado e uma quantidade desconhecida de ICTP não marcado numa amostra competem por um número limitado de locais de ligação de alta afinidade de anticorpos policlonais anti-ICTP. A radioactividade do antigénio marcado e ligado foi medida da mesma forma que fora em relação ao PINP. As concentrações das amostras em teste também foram obtidas através da respectiva curva de calibração a qual foi desenhada utilizando os valores obtidos através da avaliação dos calibradores presentes no teste cujas concentrações estavam definidas entre 0 e 50 µg/l de ICTP.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados obtidos foram analisados com recurso a um programa informático (Statistic for Windows, Statsoft, Inc., 1995, Tulsa, OK, USA). Realizou-se uma análise

de variância multivariada (MANOVA) para os diferentes efeitos seguintes: presença de lesões, nível de exercício e idade, bem como para as respectivas interações. A significância estatística considerada foi de $P < 0,05$. Os resultados foram apresentados sob a forma de médias e respectivos erro-padrão. Sempre que se verificaram diferenças significativas os dados foram posteriormente sujeitos a uma análise através de um teste de comparação *post hoc* LSD (*least significant differences*).

5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA

A avaliação radiográfica das articulações referidas na secção anterior permitiu chegar aos seguintes resultados. Do total de animais radiografados (n=50), 16% (n=8) evidenciaram algum tipo de lesão de osteocondrose numa ou em várias articulações. Após esta primeira observação foi então possível dividir os animais pelos grupos inicialmente referidos de grupo Controlo (n=42) e grupo OC (n=8) tendo em conta a ausência ou a presença de lesões respectivamente (Gráfico 1).

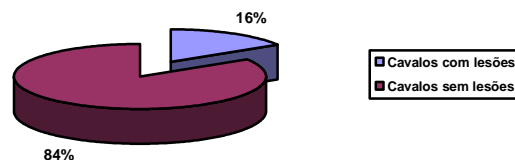


Gráfico 1 – Distribuição percentual dos cavalos que apresentaram lesões de OC no conjunto da população em estudo (n=50)

Considerando outros estudos referidos na bibliografia é possível rapidamente constatar que os valores de prevalência de lesões de OC observados neste estudo se enquadram em todas as estimativas apresentadas. As lesões aqui reportadas são todas lesões radiograficamente identificáveis pelo que podem não traduzir todas as lesões realmente presentes. Se considerarmos também aquelas lesões que ainda não têm tradução radiográfica e que afectam principalmente a cartilagem, estas não foram seguramente identificadas neste trabalho. Neste pressuposto as estimativas de van Weeren (2005) segundo o qual a incidência global de lesões de OC apontaria para 20 a 25% de cavalos afectados independentemente da espécie podem efectivamente ser atingidas. No entanto, segundo Alvarado *et al.* (1989) e O'Donohue *et al.* (1992), que apresentaram valores de incidência entre 5 e 20%, ainda que para grandes grupos de cavalos, é possível verificar que a população em estudo apresenta valores perfeitamente enquadráveis neste intervalo. Também segundo van Weeren (comunicação pessoal) para o cavalo Lusitano não seriam de esperar valores de OC muito elevados dadas as características morfológicas e de crescimento pouco precoce que caracterizam esta raça.

No que respeita à avaliação particular das diferentes articulações relativamente ao total de cavalos em estudo observaram-se valores de incidência de 6% (n=3) de cavalos com lesões nos tarsos (figuras 1 e 2) e de 12% (n=6) de cavalos com lesões nos boletos (figura 3). A discrepância que se pode observar quando comparados os valores globais com os valores observados por região anatómica, prende-se com o facto de haver um dos cavalos afectados que apresentou lesões em ambas as regiões, ou seja tanto no tarso e como no boleto.

Os valores observados para as lesões nas articulações dos tarsos são inferiores aos relatados por Hoppe e Philipsson (1985) em cavalos suecos onde se verificaram incidências entre 10 e 26%. Veen *et al.* (1994) relataram valores de 14% para as mesmas articulações em cavalos holandeses, valores estes que também são significativamente superiores aos verificados neste estudo.

Já mais próximos dos valores da literatura de 14 a 29% para articulações metacarpo- e metatarsofalângicas (Sandgren, 1988; Carlsten *et al.*, 1993; Sandgren *et al.*, 1993; Jørgensen *et al.*, 1997) foram de 12% verificados na população em estudo. Ainda assim importa referir que são valores inferiores ao limite mínimo do intervalo apontado nestas referências bibliográficas.

É possível que os valores apresentados possam sofrer algum ajuste se se realizar um estudo mais abrangente que inclua uma população bastante mais numerosa. No entanto, se se considerarem os valores relatados de 5% nos boletos e de 1% nos tarsos para populações silvestres e rústicas obtidos por Valentino *et al.* (1999), e se se tiver em conta o facto do cavalo Lusitano poder ser considerado uma raça ancestral e de algum modo possuidora de alguma rusticidade, é perfeitamente possível que os valores encontrados neste estudo sejam o reflexo real da população em geral. Poderá até ser possível obterem-se valores mais baixos que os que efectivamente se observaram considerando uma maior amostra da população.

Outro aspecto interessante tem a ver com o facto de que dos 3 animais com lesões nos tarsos, 66,7% deles (n=2) apresentaram lesões bilaterais, *i.e.*, em ambos os tarsos. No que respeita aos boletos, 33,3% dos animais (n=2) também apresentaram lesões bilaterais. A frequência de bilateralidade das lesões pode inclusivamente atingir os 50% (Hoppe, 1984; Sandgren, 1988; Alvarado *et al.*, 1989; Grøndhal, 1991; Jørgensen *et al.*, 1997). É possível que a percentagem de bilateralidade das lesões realmente presente na população em estudo também se aproxime mais dos valores relatados na literatura uma vez que as lesões

diagnosticadas foram apenas lesões radiograficamente identificáveis não incluindo todas as potencialmente existentes.

Na observação relativa das incidências de lesões nas articulações metacarpofalângicas, quando comparada com as lesões observadas nas articulações metatarsofalângicas, verificou-se que dos 12% (n= 6) de animais com lesões a este nível 83% (n=5) deles apresentavam lesões nos membros anteriores, logo nas articulações metacarpofalângicas, e apenas 17% (n=1) nas articulações metatarsofalângicas. Este facto pode dever-se às características de equilíbrio e biomecânica próprias dos cavalos nas quais o centro de gravidade se encontra sobre os membros anteriores. Tendo em conta este aspecto é de crer que esta carga mais acentuada sobre os membros anteriores aumente o risco associado a eventuais problemas de conformação anatómica e a sua potencial implicação no desenvolvimento de lesões de OC (Ytrehus *et al.*, 2007). Ainda que o factor traumático não esteja comprovadamente implicado na génese das lesões (Ytrehus *et al.*, 2007), mas atendendo ao vasto leque de factores que poderão interagir no desenvolvimento destas lesões, não será sensato descartar esta hipótese como provável elemento co-responsável na patogénese das mesmas.

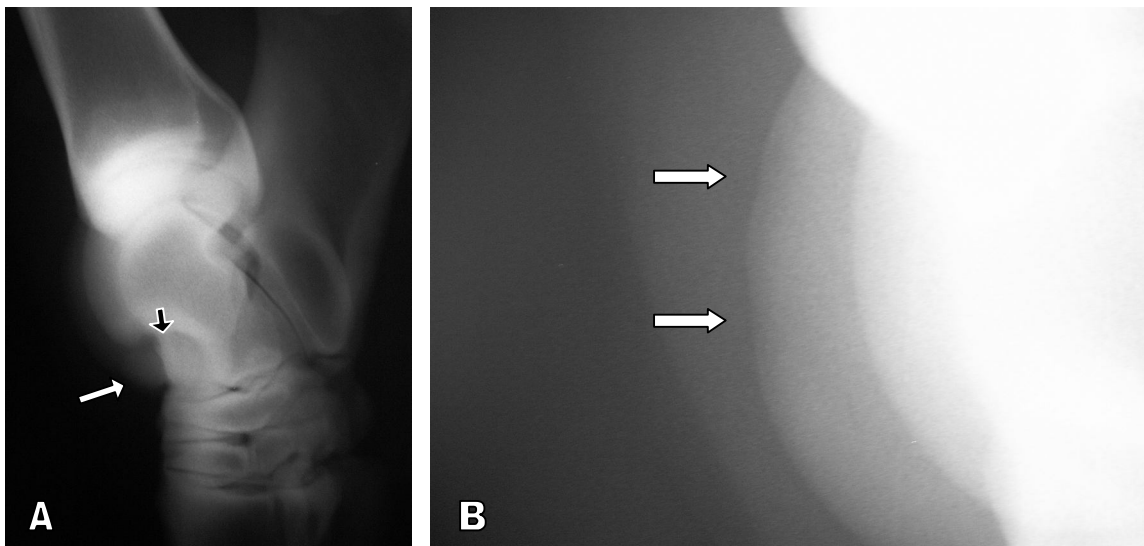


Figura 1 – Lesões de OC identificadas nos tarsos A) Lesão na eminência troclear lateral do astrágalo com presença de fragmento de dimensões apreciáveis (seta branca) e respectiva indentação no “osso mãe” (seta preta); B) Lesão de OC de aplanamento da eminência troclear lateral do astrágalo (setas).

Uma outra abordagem aos resultados radiográficos da população em estudo diz respeito às diferenças observadas entre os cavalos que apresentavam lesões de OC e que estavam incluídos em diferentes grupos no que respeita ao regime de exercício a que estavam sujeitos, bem como à sua inclusão em diferentes grupos etários.

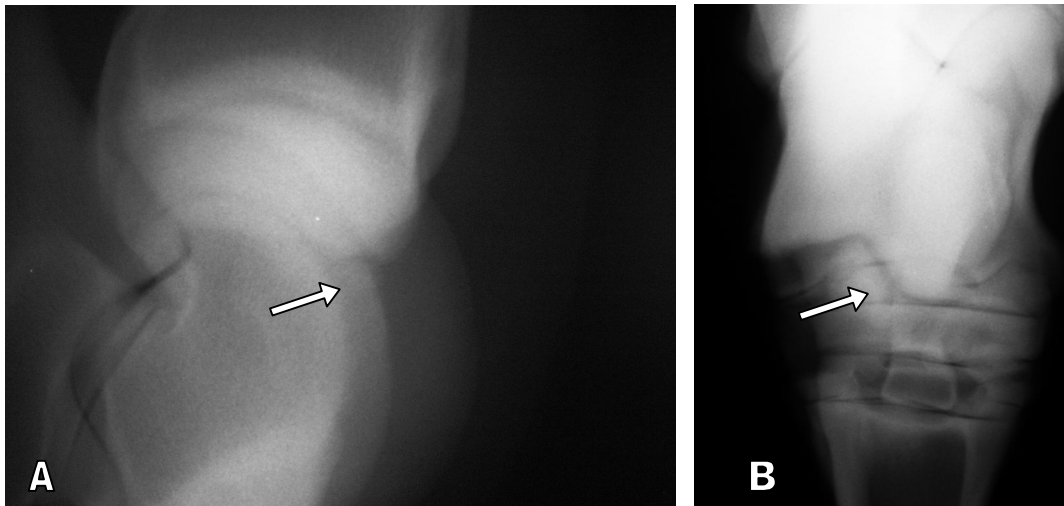


Figura 2 – Lesões de OC identificadas nos tarsos A) Lesão de OC na crista sagital da tíbia distal com presença de fragmento (seta); B) Lesão na eminência troclear lateral do astrágalo com presença de fragmento de dimensões apreciáveis (seta). Mesma lesão da figura 1 A).

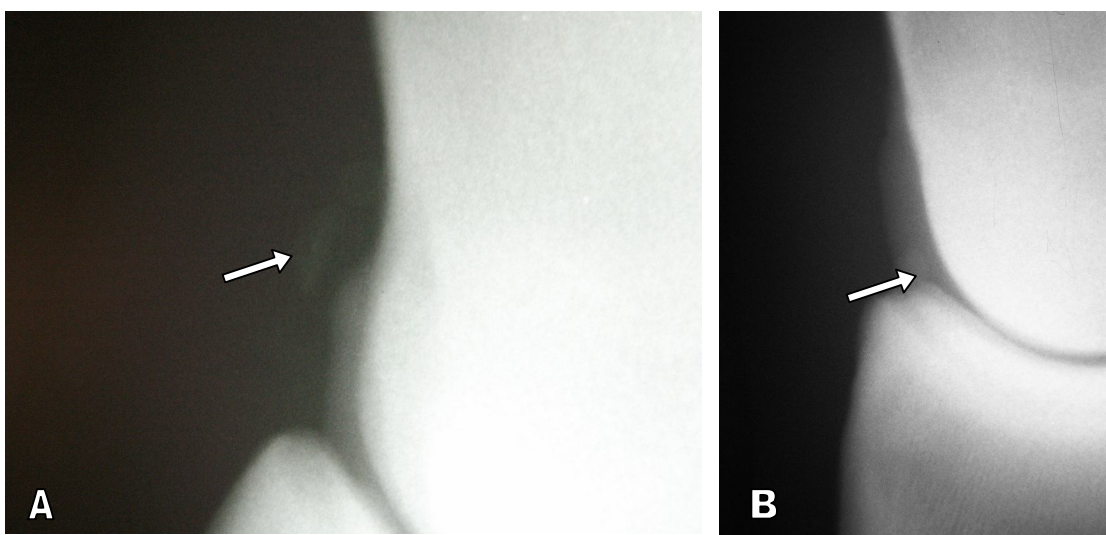


Figura 3 – Lesões de OC identificadas nos boletos A) Lesão de OC na crista sagital do terceiro metacarpiano com presença de fragmento (seta); B) Lesão no bordo dorsoproximal da primeira falange (seta).

Foi pois possível verificar que dos animais com lesões, 25% (n=2) estavam sujeitos ao regime de exercício mais ligeiro (grupo D) em contraste com os 75% (n=6) sujeitos ao regime mais intenso (grupo T). Por outro lado, e relativamente a diferentes grupos etários, 62,5% (n=5) dos animais com lesões pertenciam ao grupo A (< 10 anos) e 37,5% (n=3) ao grupo B (> 10 anos). Estas observações não acrescentam nenhuma conclusão significativa relativamente a qualquer um dos aspectos em estudo nem apresentam qualquer correlação com os dados bibliográficos anteriormente referidos.

5.2 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DOS BIOMARCADORES ÓSSEOS

Os resultados observados após a avaliação laboratorial do soro dos animais em estudo, tendo em consideração os agrupamentos previamente estabelecidos nas diferentes abordagens analíticas (grupo controlo vs. grupo OC; grupo T vs. grupo D e grupo A vs. grupo B), estão traduzidos nos gráficos seguintes. Estes gráficos representam sequencialmente os valores observados de cada biomarcador estudado relativamente à comparação entre os diferentes grupos considerados. Os valores apresentados correspondem às médias dos diferentes parâmetros avaliados e que foram posteriormente sujeitas a análise de significância.

A comparação entre os valores obtidos para os diferentes biomarcadores ósseos e a presença ou ausência de lesões de OC (gráficos 2,3,4 e 5), não revelou quaisquer diferenças significativas ($P>0,05$).

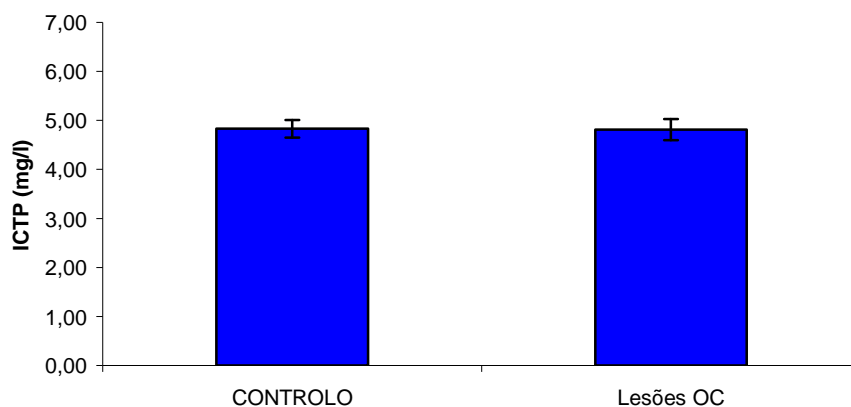


Gráfico 2 – Valores séricos de ICTP nos grupos Controlo (ausência de lesões de OC) (n=42) e Lesões OC (evidência de lesões de OC) (n=8) não apresentando diferenças significativas

($P > 0,05$). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

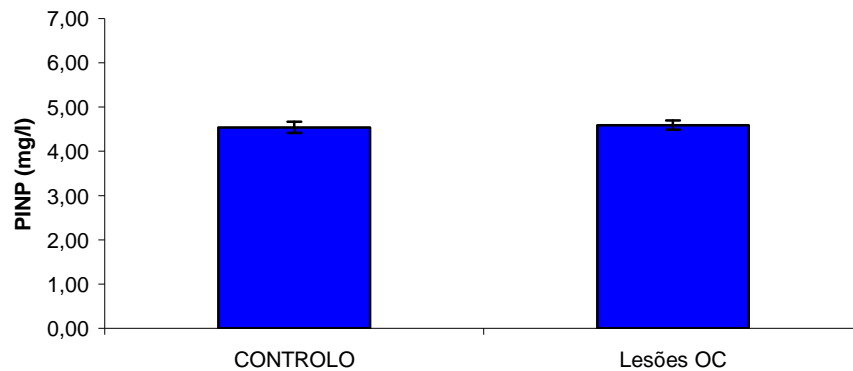


Gráfico 3 – Valores séricos médios de PINP nos grupos Controlo (ausência de lesões de OC) (n=42) e Lesões OC (evidência de lesões de OC) (n=8) não apresentando diferenças significativas ($P > 0,05$). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

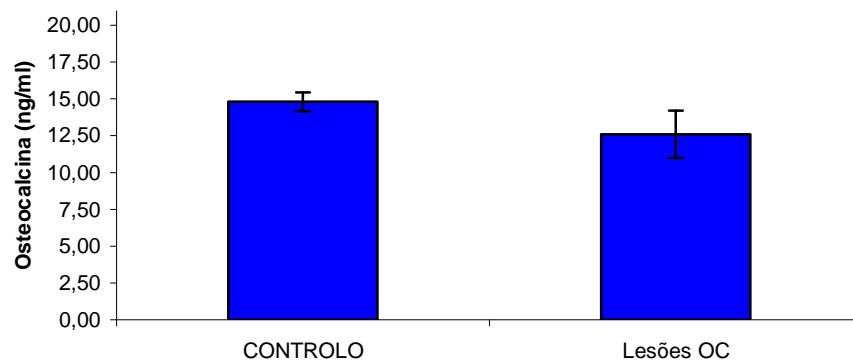


Gráfico 4 – Valores séricos médios de Osteocalcina nos grupos Controlo (ausência de lesões de OC) (n=42) e Lesões OC (evidência de lesões de OC) (n=8) não apresentando diferenças significativas ($P > 0,05$). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

A ausência de diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo OC não causa *per se* estranheza se forem considerados alguns aspectos importantes de estudos anteriores, bem como o próprio delineamento experimental deste estudo. Os estudos anteriores que evidenciaram alguma correlação entre a presença de lesões de OC e alterações dos níveis séricos de alguns biomarcadores (Billinghurst *et al.*, 2004) foram realizados em animais até aos 24 meses. Este facto é muito significativo dadas as características metabólicas destes cavalos que se encontram em plena fase de crescimento. Os cavalos que foram sujeitos ao presente estudo podem considerar-se

possuidores de um esqueleto maduro que não traduz as mesmas alterações metabólicas verificadas em animais jovens e que também são distintas das alterações

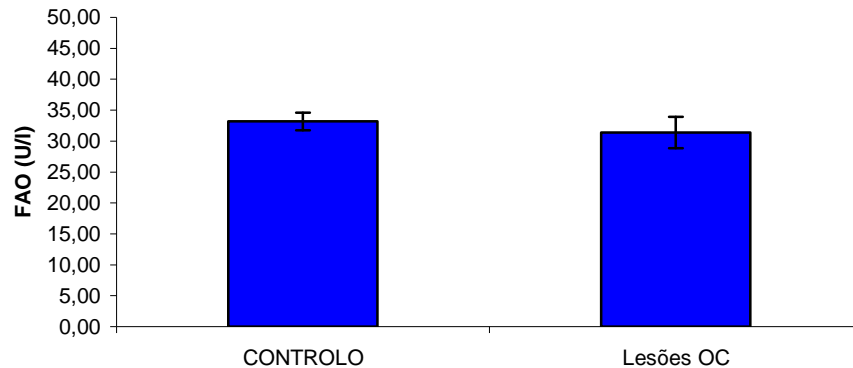


Gráfico 5 – Valores séricos médios de FAO nos grupos Controlo (ausência de lesões de OC) (n=42) e Lesões OC (evidência de lesões de OC) (n=8) não apresentando diferenças significativas ($P>0,05$). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

secundárias às lesões de OC primária. Os estudos de Billingham *et al.* (2004) permitiram chegar a conclusões acerca da severidade das lesões mas não em relação à presença ou ausência das mesmas. Mais uma vez as observações de Ytrehus *et al.* (2007) fazem todo o sentido quando este refere o enfoque que é dado às lesões radiográfica e clinicamente identificáveis cuja severidade é indubitavelmente maior que os casos subclínicos em que a existência de complicações secundárias às lesões primárias de OC ainda não é um facto determinante. Ainda assim, Pool (1996) referiu a existência de níveis séricos elevados de osteocalcina em cavalos com OA. Também Price *et al.* (1997) referiram a existência de concentrações significativamente elevadas de ICTP em animais com DOD. Contudo, este estudo não revelou as mesmas conclusões.

Por outro lado importa não esquecer o papel importante destes biomarcadores na monitorização do metabolismo ósseo bem como da evolução de eventuais lesões. Nesta perspectiva este factor acabou por não poder ser evidenciado uma vez que não foi feita uma avaliação sequencial dos cavalos em estudo mas sim uma avaliação pontual e não reiterada.

Da análise aos resultados obtidos através da avaliação dos grupos D e T foi possível constatar que entre os dois regimes de exercício não foram evidenciadas diferenças significativas ($P>0,05$) para as concentrações séricas de ICTP (gráfico 6), PINP (gráfico 7) e osteocalcina (gráfico 8). Contudo observou-se que os animais

sujeitos ao regime de exercício no grupo T apresentaram valores superiores de FAO indicando um aumento significativo da FAO sérica relacionada com um nível de actividade física superior ($P < 0,05$) (gráfico 9).

Apesar das referências de um estudo de Jackson *et al.* (2003), segundo o qual os níveis séricos de ICTP e osteocalcina se revelaram significativamente inferiores em animais exercitados, este estudo não apresentou diferenças significativas nestes dois biomarcadores. Como a FAO é um biomarcador de deposição óssea tal como a osteocalcina seria de esperar um resultado semelhante. Aliás, também no trabalho de revisão de Harris (1997) foi possível verificar que em resposta a uma maior intensidade de exercício físico se verificou também um aumento das concentrações de PICP e de FAO. Seguindo a lógica deste trabalho e da resposta fisiológica do osso ao exercício, seria de esperar um resultado em tudo semelhante ao obtido uma vez que o próprio exercício se constitui como factor de aumento do metabolismo ósseo em geral e da deposição óssea em particular.

Convém no entanto fazer aqui uma nota relativa à verdadeira influência do exercício neste trabalho uma vez que, como foi oportunamente referido, não foi considerado um grupo controlo que não estivesse sujeito a qualquer tipo de exercício condicionado. É possível que as diferenças pudessem apresentar-se mais acentuadas já que todos os cavalos dos grupos estudados estavam sujeitos a algum grau de exercício físico, ainda que a níveis distintos.

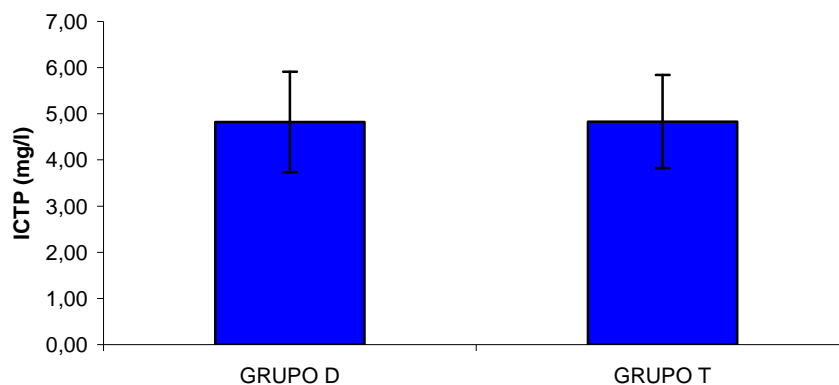


Gráfico 6 – Valores séricos de ICTP nos grupos D (trabalho menos intenso) ($n=19$) e T (trabalho mais intenso) ($n=31$) não apresentando diferenças significativas ($P > 0,05$). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

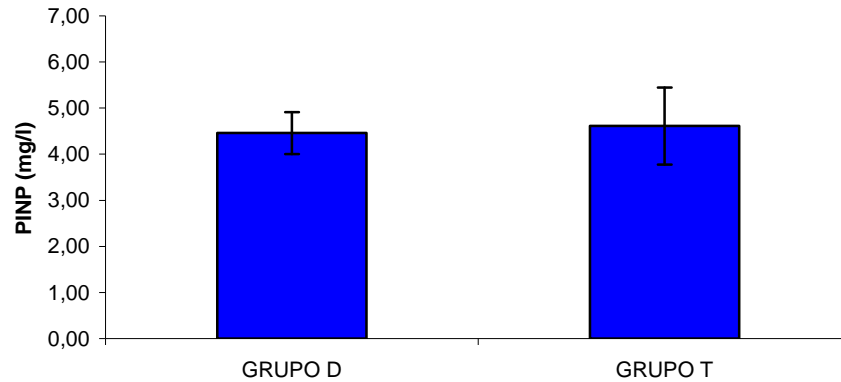


Gráfico 7 – Valores séricos médios de PINP nos grupos D (trabalho menos intenso) (n=19) e T (trabalho mais intenso) (n=31) não apresentando diferenças significativas ($P>0,05$). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

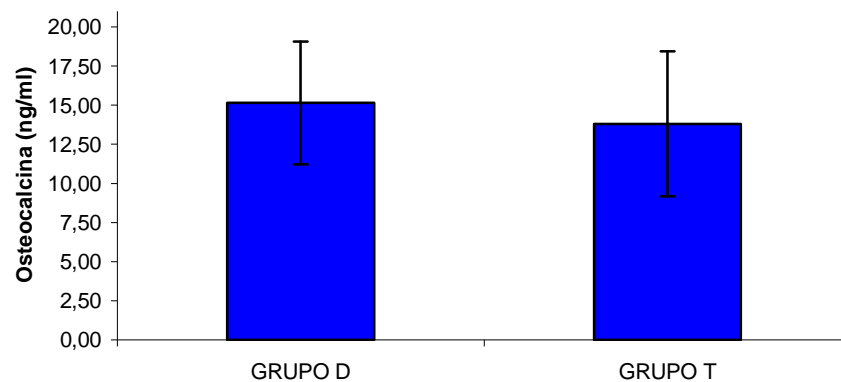


Gráfico 8 – Valores séricos médios de Osteocalcina nos grupos D (trabalho menos intenso) (n=19) e T (trabalho mais intenso) (n=31) não apresentando diferenças significativas ($P>0,05$).

Os valores representam a média \pm erro-padrão.

Na comparação entre grupos etários (Tabela 3) foi possível verificar que os valores de dois dos parâmetros bioquímicos analisados apresentaram alterações interessantes. Os animais mais velhos revelaram uma tendência para apresentar valores séricos de osteocalcina mais baixos ($P=0,08$). Por seu turno, os valores de ICTP revelaram uma diferença significativa entre os dois grupos ($P<0,05$) indicando também valores claramente mais reduzidos no grupo dos animais mais velhos. Estas observações acabam por corroborar as conclusões de vários investigadores segundo as quais à medida que os animais crescem é possível observar uma clara tendência para a diminuição dos níveis séricos dos biomarcadores ósseos (Price, 1998). Animais

jovens apresentam em geral valores séricos mais elevados de ICTP. Este facto revela uma tendência para o decréscimo da actividade relacionada com o processo de renovação óssea traduzindo o aumento de maturidade esquelética característico da progressão etária (Price, 1998). Em contraste, nos animais jovens em geral, os biomarcadores ósseos apresentam concentrações séricas mais elevadas devido à elevada taxa de renovação óssea existente durante o crescimento ósseo (Rosal e Capen, 1997).

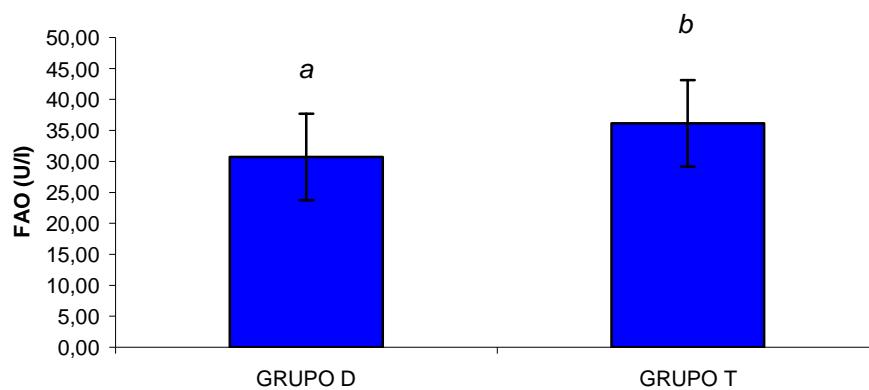


Gráfico 9 – Valores séricos médios de FAO nos grupos D (trabalho menos intenso) (n=19) e T (trabalho mais intenso) (n=31). ^a e ^b – letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05). Os valores representam a média ± erro-padrão.

Também Price *et al.* (1995b) relataram a diminuição dos níveis de biomarcadores de formação óssea, FAO e PICP, relacionada com a progressão da idade.

Ainda que a generalidade da população em estudo correspondesse a cavalos esqueleticamente maduros é importante reter a informação que este tipo de análise acaba por revelar e realçar a sua utilidade em termos de acompanhamento do metabolismo ósseo ao longo da vida dos animais.

Posteriormente, e na sequência da avaliação de possíveis interações entre os diferentes factores, presença de lesões, nível de exercício e idade, foi possível também evidenciar alguns factos particularmente interessantes.

Quando se consideraram como variáveis a presença de lesões e o nível de exercício e a respectiva interacção, foi possível verificar a existência de uma tendência para um aumento dos valores de FAO nos cavalos sem lesões sujeitos ao nível de

exercício menos intenso (D) quando comparados com o grupo de animais sem lesões sujeitos ao nível de exercício mais intenso (T) ($P = 0,08$).

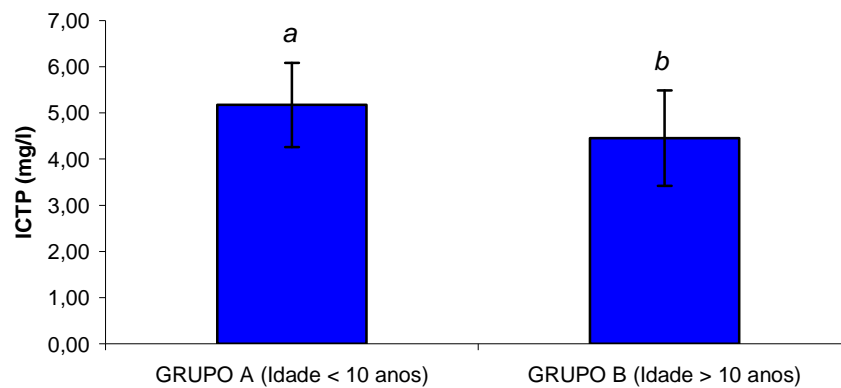


Gráfico 10 – Valores séricos médios de ICTP nos grupos A (idade < 10 anos) ($n=26$) e B (idade > 10 anos) ($n=24$). ^a e ^b – letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

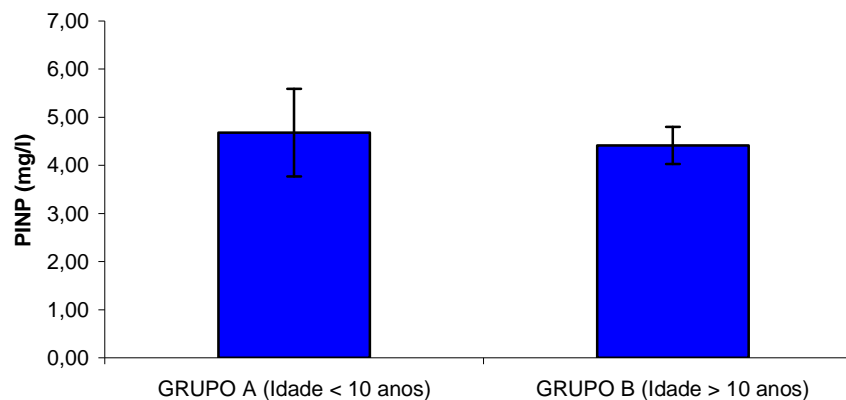


Gráfico 11 – Valores séricos médios de PINP nos grupos A (idade < 10 anos) ($n=26$) e B (idade > 10 anos) ($n=24$) não evidenciando diferenças significativas ($P > 0,05$). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

Este facto vem de alguma forma contrariar os resultados obtidos na primeira análise pois o grupo mais exercitado apresenta aqui valores de FAO mais baixos. Por outro lado acaba por poder reforçar a ideia de que um exercício mais intenso pode de facto traduzir uma maior deposição de osso. Ainda assim é importante assinalar que há uma tendência e não uma diferença significativa nas interações estudadas

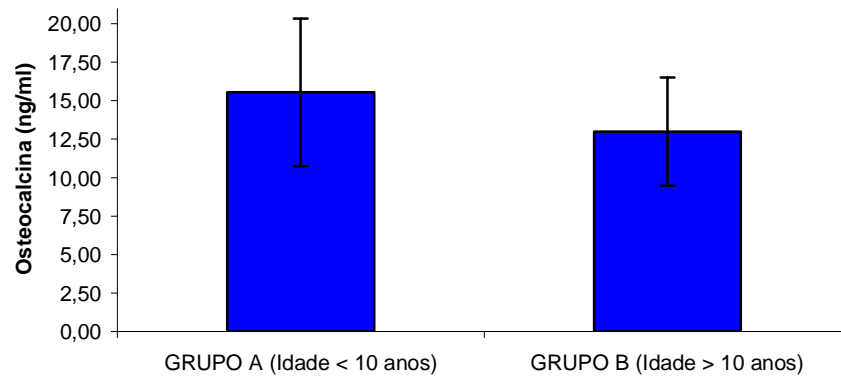


Gráfico 12 – Valores séricos médios de Osteocalcina nos grupos A (idade < 10 anos) (n=26) e B (idade > 10 anos) (n=24) não evidenciando diferenças significativas ($P > 0,05$). Contudo verificou-se uma tendência ($P = 0,08$) para uma diminuição da concentração de osteocalcina no grupo de cavalos mais velhos. Os valores representam a média \pm erro-padrão.

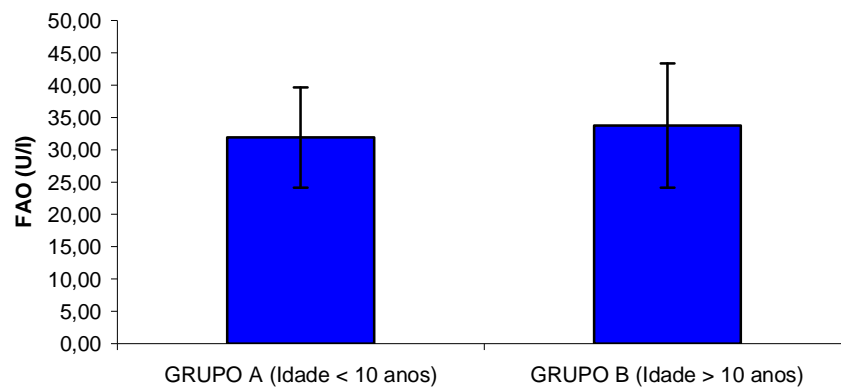


Gráfico 13 – Valores séricos de FAO nos grupos A (idade < 10 anos) (n=26) e B (idade > 10 anos) (n=24) não evidenciando diferenças significativas ($P > 0,05$). Os valores representam a média \pm erro-padrão.

Quanto à análise da interação entre a presença de lesões e o factor idade, foi possível verificar que os valores de ICTP eram significativamente menores ($P < 0,05$) entre os animais com idade inferior a 10 anos e que não apresentavam lesões de OC relativamente aos animais que, não apresentando também lesões de OC, tinham idades superiores a 10 anos (Tabela 5). Neste caso é possível verificar sinais de menor reabsorção óssea nos animais mais jovens e que também não apresentavam lesões.

Tabela 5 – Interações estatisticamente significativas dos valores de ICTP obtidos durante o estudo

| Interação entre grupos | Nível de significância |
|--|------------------------|
| Idade < 10 anos x Ausência de lesões de OC | P=0,05 |

Relativamente à osteocalcina, e tendo em conta a interação entre a presença de lesões e o factor idade, foi possível observar uma diminuição significativa dos valores de osteocalcina entre os animais que apresentavam lesões e cuja idade era inferior a 10 anos, os animais sem lesões e idade inferior a 10 anos e os animais sem lesões e idade superior a 10 anos todos estes relativamente aos animais que, apresentando lesões de OC, tinham idades superiores a 10 anos (Tabela 6).

Este conjunto de resultados sugere que nos animais com idade mais avançada, a presença de lesões condiciona um valor de osteocalcina sérica significativamente mais elevado. Este facto deve-se provavelmente à consequente deposição de osso subcondral próprio de estados degenerativos que traduzem a repercussão patofisiológica da presença de lesões articulares de OC e sua consequente evolução.

Tabela 6 – Interações estatisticamente significativas dos valores de osteocalcina obtidos durante o estudo

| Interação entre grupos | Nível de significância |
|--|------------------------|
| Idade < 10 anos x Presença de lesões de OC | P=0,05 |
| Idade < 10 anos x Ausência de lesões de OC | P=0,01 |
| Idade > 10 anos x Ausência de lesões de OC | P=0,04 |

Apesar de os resultados obtidos permitirem fundamentar algumas referências da literatura, não é menos verdade que seria importante realizar uma avaliação sequencial e reiterada dos cavalos em estudo. Os valores obtidos para alguns biomarcadores ósseos, segundo Price (1998) e Price *et al.* (2001) através de estudos de monitorização da actividade celular realizados em cavalos Puro Sangue Inglês em crescimento, apresentam variações importantes entre medições sequenciais evidenciando uma grande limitação na utilidade real de amostras únicas em pacientes isolados. O estudo realizado nesta população não realizou nenhum contraste posterior. Segundo estes mesmos autores (1998) as potenciais aplicações clínicas da avaliação sérica dos biomarcadores incluiria a identificação de animais em risco de desenvolverem distúrbios esqueléticos e promover uma abordagem objectiva à monitorização da eficácia de regimes de tratamento destes e de outros problemas ósseos.

6 CONCLUSÃO

Foram várias as vicissitudes pelas quais passou este trabalho. Das mais condicionantes acaba por ser a dificuldade que continua a existir na realização de estudos em cavalos em Portugal, quer seja pela disponibilidade de grupos animais com os quais se possa fazer trabalho de investigação, quer pelas limitações técnicas e estruturais a que estes estudos obrigam nesta espécie. Ainda assim foi possível e os resultados apresentados comprovam-no. Difícil mas não impossível.

Os diferentes estudos efectuados e apresentados na revisão bibliográfica são muitas vezes contraditórios entre si, ou então apresentam perspectivas diferentes de uma mesma realidade cujo valor em termos finais pode então apontar para diferentes conclusões. Também neste trabalho os resultados dos níveis de biomarcadores ósseos vieram acentuar alguma desta disparidade de conclusões. Ainda assim é importante realçar que alguns dos resultados obtidos corroboram outros estudos realizados, dando-lhes uma maior consistência na tradução prática de elementos importantes à realização de futuros estudos em cavalos mais velhos em geral e no Lusitano em particular.

Tendo em conta as estimativas relatadas por van Weeren (2005) relativas aos valores de incidência de OC, os dados obtidos através do presente estudo apresentam valores que se enquadram perfeitamente dentro das expectativas. Apesar de se tratar de uma pequena amostragem de apenas 50 animais, é importante referir que se trata do primeiro estudo que apresenta valores de prevalência desta entidade patológica no cavalo Lusitano. Este facto é também um elemento de grande importância na caracterização deste distúrbio no puro sangue Lusitano. Poderá, e deverá, ser um elemento contributivo importante na eventual reestruturação dos critérios de selecção de reprodutores desta raça. Este trabalho deveria poder traduzir na prática uma preocupação presente em toda a indústria da produção de cavalos em Portugal.

A importância do exercício e a sua influência no metabolismo ósseo está hoje em dia sobejamente fundamentada. Mesmo assim, e apesar da limitação referida quanto à realização de estudos incluindo um grupo controlo de animais não sujeitos a qualquer tipo de exercício, foi possível verificar a existência de diferenças ao nível dos biomarcadores ósseos estudados que permitem acentuar a sua importância na monitorização dos programas de trabalho a que são sujeitos os cavalos em geral e os

Lusitanos em particular. Esta informação, veiculada de forma correcta e numa perspectiva muito prática, aos produtores e tratadores de cavalos pode obviar muitos problemas e perdas económicas desnecessárias. Além disso, o cariz não invasivo da avaliação sérica dos biomarcadores ósseos permite uma avaliação constante e que em nada condiciona esses mesmos programas uma vez que os cavalos podem continuar a trabalhar mesmo sendo sujeitos a esta monitorização.

Não sendo esta a população ideal para comparar a influência da idade na tradução bioquímica do metabolismo ósseo, uma vez que todos os cavalos incluídos no estudo já tinham atingido a sua maturidade esquelética, as alterações em animais mais velhos podem no entanto fornecer informações muito úteis sobre fases mais avançadas desse mesmo metabolismo e a influência de diferentes factores na manutenção do equilíbrio entre a formação e deposição ósseas.

A interdisciplinaridade que deve orientar estes estudos é um factor fundamental ao sucesso dos mesmos e à obtenção de resultados cada vez mais consistentes. A associação de várias áreas de interesse no estudo do metabolismo ósseo e as suas repercussões clínicas é fundamental na compreensão e esclarecimento de um sem número de entidades patológicas com sede osteoarticular.

7 BIBLIOGRAFIA

- Aldred, J. (1998). Developmental Orthopaedic Diseases in the Horse. *RIRDC Publication* N°. 97/79
- Allen, M.J. (2003) Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet Clin Pathol.* 32:101-113.
- Alvarado, A.F.; Marcoux, M.; Breton, L. (1989) The incidence of osteochondrosis in a Standardbred breeding farm in Quebec. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners.* 35:293-307.
- Arnaud, C.D. (1996) Osteoporosis: Using "bone markers" for diagnosis and monitoring. *Geriatrics.* 51:24-30.
- Bathe, A.P. (1994) 245 fractures in Thoroughbred racehorses: results of a 2-year prospective study in Newmarket. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners.* 40:275-276.
- Bélanger, L.F.; Robichon, J.; Migicovsky, B.B.; Copp, D.H.; Vincent, J. (1963) Resorption without osteoclasts (osteolysis). *In Sognnaes.*
- Bertone, A.L.; Bramlage, L.R.; McIlwraith, C.W.; Malmud, C.J. (2005) Comparison and collagen in articular cartilage of horses with naturally developing osteochondrosis and healing osteochondral fragments of experimentally induced fractures. *Am J Vet Res.* 66:1881-1890.
- Billinghamurst, R.C.; Brama, P.A.J.; van Weeren, P.R.; Knowlton, M.S.; McIlwraith, C.W. (2003) Significant exercise-related changes in the serum levels of two biomarkers of collagen metabolism in young horses. *Osteoarthritis and Cartilage.* 11:760-769.
- Billinghamurst, R.C.; Brama, P.A.J.; van Weeren, P.R.; Knowlton, M.S.; McIlwraith, C.W. (2004) Evaluation of serum concentrations of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals. *Am J Vet Res.* 65(2):143-150.
- Black, A.; Schoknecht, P.A.; Ralston, S.L.; Shapses, S.A. (1998) Diurnal variation and age differences in the biochemical markers of bone turnover in horses. *Journal of Animal Science* 77:75-83.
- Bohndorf, K. (1998) Osteochondritis (osteochondrosis) dissecans: a review and new MRI classification. *Eur Radiol* 8:103-112.
- Brama, P.A.J.; Tekoppele, J.M.; Bank, R.A.; van Weeren, P.R.; Barneveld, A. (1999) Influence of different exercise levels and age on the biochemical characteristics of immature equine articular cartilage. *Equine Vet J. Suppl.* 31:55-61.
- Bridges, C.H.; Harris, E.D. (1988) Experimentally induced cartilaginous fractures (osteochondritis dissecans) in foals fed low-copper diets. *J Am Vet Med Assoc.* 193:215.

- Camarda, A.J.; Butler, W.T.; Finkelman, R.D.; Nanci, A. (1987) Immunocytochemical localization of carboxyglutamic acid-containing proteins (osteocalcin) in rat bone and dentine. *Calcified Tissue International*. 40:349-355.
- Carey, D.E.; Goldberg, B.; Ratzan, S.K.; Rubin, K.R.; Rowe, D.W. (1985) Radioimmunoassay of type I procollagen in growth hormone deficient children before and during treatment with growth hormone. *Pediatr Res*. 19:8-11.
- Carlson, C.S.; Cullins, L.D.; Meuten, D.J. (1995) Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply. *Vet Pathol*. 32:641-647.
- Carlson, C.S.; Hilley, H.D.; Meuten, D.J.; Hagan, J.M.; Moser, R.L. (1988) Effect of reduced growth rate on the prevalence and severity of osteochondrosis in gilts. *Am J Vet Res* 49:396-402.
- Carlsten, J.; Sandgren, B.; Dalin, G.; (1993) Development of osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints of Standardbred trotters. 1. Radiological survey. *Equine Vet J*. 16(Suppl):42-47.
- Carstanjen, B.; Amory, H.; Sulon, J.; Hars, O.; Remy, B.; Langlois, P.; Lepage, O.M. (2005) Serum osteocalcin and CTX-MMP concentration in young exercising thoroughbred racehorses. *J Vet Med A* 52:114-120.
- Carstanjen, B.; Hoyle, N.R.; Gabriel, A.; Hars, O.; Sandersen, C.; Amory, H.; Remy, B. (2004) Evaluation of plasma carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen concentration in horses. *Am J Vet Res* 65:104-109.
- Christenson, R.H. (1997) Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem*. 30:573-593.
- Coen, G.; Mazzaferro, S.; Ballanti, P. *et al.* (1992) Procollagen type I C-terminal extension peptide in predialysis chronic renal failure. *Am J Nephrol*. 12:246-251.
- Coleman, R.E.; Mashiter, G.; Fogelman, I. *et al.* (1988) Osteocalcin: a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 24:1211-1217.
- Davicco, M.J.; Faulconnier, Y.; Coxham, V.; Dubroeuq; Martin-Rosset, W.; Barlet, J.P. (1994) Systemic bone growth factors in light breed mares and their foals. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique* 102 :115-119.
- De Lahunta, A.; Hedhammar, A.; Wu, F.M.; Krook, L. (1974) Overnutrition and skeletal disease. An experimental study in growing Great Dane dogs. VII. Cervical vertebrae and spinal cord. *Cornell Vet* 64 (Suppl 5):58-71.
- Deftos, L.; Wolfert, R.; Hill, C. (1991) Bone alkaline phosphatase in Paget's disease. *Horm Metab Res*. 23:559-561.
- Delmas, P.D.; Eastell, R.; Garnero, P.; Seibel, M.J.; Stepan, J. (2000) The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 6:S2-17.

- Denoix, J.M.; Audigié, F. (2004). Imaging of the musculoskeletal system in horses. Chapter-10. *In: Equine Sports Medicine and Surgery – basic and clinical sciences of the equine athlete.* ed: Hinchcliff, K.W.; Kaneps, A.J. and Geor, R.J.; pp. 161-186. Elsevier Limited.
- Dewey, C. (1999) Diseases of the nervous and locomotor systems. *In: Diseases of Swine*, ed: Straw, B.; D'Allaire, S.; Mengeling, W. e Taylor, D. 8th ed., pp. 861-883. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Dik, K.J.; Enzerink, E.; van Weeren, P.R. (1999) Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months. *Equine Vet J. Suppl.* 31:9-15.
- Done, S.H.; Goody, P.C. (1995) Recent advances in bone pathology with special reference to pigs. *The Pig Journal.* 36:125-149
- Ducy, P.; Desbois, C.H.; Boyce, B.; Pinero, G.; Story, B.; *et al.* (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 382:448-452.
- Eastell, R.; Delmas, P.D.; Hodgson, S.F.; Eriksen, E.F.; Mann, K.G.; Riggs, B.L. (1988) Bone formation rate in older normal women: concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. *J Clin Endocrinol Metab.* 67:741-748.
- Ebeling, P.R.; Peterson, J.M.; Riggs, B.L. (1992) Utility of type I collagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *J Bone Miner Res.* 7 (11):1243-1250.
- Ekman, S.; Carlson, C.S.; (1998) The pathophysiology of osteochondrosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 28:17-32.
- Ekman, S.; Heinegård, D.; Johnell, O.; Rodriguez-Martinez, H. (1990) Immunohistochemical localization of proteoglycans and non-collagenous matrix proteins in normal and osteochondrotic porcine articular-epiphyseal cartilage complex. *Matrix* 10:402-411.
- Eriksen ; E.F.; Charles, P.; Melen, F. *et al.*. (1993) Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation to bone histomorphometry. *J Bone Miner Res.* 8:127-32.
- Estberg, L.; Stover, S.M.; Gardner, I.A.; Drake, C.M.; Johnson, B.; Ardans, A. (1996) High-speed exercise history and catastrophic racing fracture in Thoroughbreds. *Am J Vet Res.* 57:1549-1555.
- Frost, H.M. (1983) The regional acceleratory phenomenon: a review. *Henry Ford Hosp Med J.* 31:3-9.
- Frost, H.M.; Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): Redefining Wolff's law: The bone modelling problem. *Anat Rec.* 226:403-413.
- Gabel, A.A. (1988) Metabolic bone disease: problems of terminology. *Equine Vet J.* 20: 4-6.

Gerber, H.P. ; Vu, T.H.; Ryan, A.M.; Kowalski, J.; Werb, Z.; Ferrara, N. (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodelling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 5:623-628.

Girard, C.; Lepage, O.M.; Rossier, Y. (1997) Multiple vertebral osteochondrosis in a foal. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 9:436-438.

Glade, M.J.; Belling, T.H. (1984) Growth plate cartilage metabolism, morphology and biochemical composition in over- and underfed horses. *Growth.* 48:473.

Glade, M.J.; (1986) The control of cartilage growth in osteochondrosis: A review. *J Equine Vet Sci.* 6:175.

Glade, M.J.; (1987) The role of endocrine factors in equine developmental orthopaedic disease. *Proc Am Assoc Equine Pract.* 33:171.

Gray, J. A. (1996) Investigations into the use of biochemical markers of bone metabolism in the horse. *PhD thesis.* University of Cambridge

Grøndahl, A.M. (1991) The incidence of osteochondrosis in the tibiotarsal joint of Norwegian Standardbred trotters: a radiographic study. *Equine Vet Sci* 11:272-274.

Grøndahl, A.M.; Dolvik, N.I. (1993) Heritability estimations of osteochondrosis in the tibiotarsal joint and of bony fragments in the palmar/plantar portion of the metacarpal and metatarsophalangeal joints of horses. *J Am Vet Med Assoc.* 203:101-104.

Grøndalen, T. (1974a) Osteochondrosis and arthrosis in pigs. II. Incidence in breeding animal. *Acta Vet Scand.* 15:26-42.

Grøndalen, T. (1974b) Osteochondrosis and arthrosis in pigs. III. A comparison of the incidence in young animals of the Norwegian Landrace and Yorkshire breeds. *Acta Vet Scand.* 15:43-52.

Grøndalen, T. (1974c) Osteochondrosis and arthrosis in pigs. IV. Relationship to feed level and calcium phosphorus and protein levels in the ration. *Acta Vet Scand.* 15:147-169.

Grøndalen, T. (1974d) Osteochondrosis, arthrosis and leg weakness in pigs. *Nord Vet Med.* 26: 534-537.

Grøndalen, T. (1981) Osteochondrosis and arthrosis in Norwegian slaughter-pigs in 1980 compared to 1970. *Nord Vet Med.* 33:417-422.

Grøndalen, T.; Vangen, O. (1974) Osteochondrosis and arthrosis in pigs. V. A comparison of the incidence in three different lines of the Norwegian Landrace breed. *Acta Vet Scand.* 15:61-79.

Hank, A. M.; Hoffmann, W. E.; Saneki, R. K.; Schaeffer, D. J.; Domer, J. L. (1993) Quantitative determination of equine alkaline phosphatase isoenzymes in foal and adult serum. *J Vet Int Med.* 7:20-24.

Hanson, J.; Seeherman, H.; O'Callaghan, M. (1996) The role of CT in the evaluation of subchondral osseous lesions in seven horses with chronic synovitis. *Equine Vet J.* 28:480-488.

- Harari, J. (1998) Osteochondrosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 28:87-94.
- Harris, P; Gray, J.A. (1997) Biochemical bone markers. *In : Current therapy in Equine Medicine 4.ed* : Robinson, N.E. W.B. Saunders.USA
- Hauschka, P.V.; Reid, M.L. (1978) Vitamin K dependence of a calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid in chicken bone. *J Biol Chem.* 253:9063-9068.
- Hauschka, P.V.; Frenkel, J.; Demuth R. (1983) Presence of osteocalcin and related higher molecular weight γ -carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone. *J Biol Chem.* 258:176-182.
- Helminem, H.J.; Hyttinen, M.M. ; Lammi, M.J. *et al.* (2000) Regular joint loading in the youth assists in the establishment and strengthening of the collagen network of articular cartilage and contributes to the prevention of osteoarthritis later in life : A hypothesis. *J Bone Min Metab.* 18:245.
- Henson, F.M.D.; Davenport, C.; Butler, L. *et al.* (1997) Effects of insulin and Insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine Vet J.* 29 :441.
- Hertel, N.T. ; Stoltenberg, M. ; Juul, A. *et al.*. (1993) Serum concentrations of type I and III procollagen propeptides in healthy children and girls with central precocious puberty during treatment with gonadotropin-releasing hormone analog and cyproterone acetate. *J Clin Endocrinol Metab.* 76(4):924-927.
- Hiney, K.M.; Potter, G.D.; Gibbs, P.G.; Bloomfield; S. M. (2000) Response of serum biochemical markers of bone metabolism to training in the juvenile racehorse. *J Eq Vet Sci.* 20:851.
- Hoppe, F. (1984) Osteochondrosis in Swedish horses, a radiological and epidemiological study with special reference to frequency and heredity. *PhD thesis*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Hoppe, F.; Philipsson, J. (1985) A genetic study of osteochondrosis in swedish horses. *Equine Practice.* 7:7-15.
- Howald, H. (1942) Zur Kenntnis der Ostochondrosis dissecans (Osteochondritis dissecans) *Archiv fur orthopaedische und Unfall-Chirurgie.* 41:730-788.
- Hurtig, M.B.; Pool, R.R. (1996) Pathogenesis of equine osteochondrosis. *In: Joint Disease in the Horse.* ed: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, pp. 362-383. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Hurtig, M.; Green, S.L.; Dobson, H.; *et al.* (1991) Defective bone and cartilage in foals fed a low-copper diet. *Proc Am Assoc Equine Pract.* 36:637-643.
- Hurtig, M.; Green, S.L.; Dobson, H.; Mikuni-Takagaki, Y.; Choi, J. (1993) Correlative study of defective cartilage and bone growth in foals fed a low-copper diet. *Eq Vet J.* 16(Suppl):66-73.
- Jackson, B.F.; Blumsohn, A.; Goodship, A.E.; Wilson, A.M.; Price, J.S. (2003) Circadian variation in biochemical markers of bone cell activity and insulin-like growth factor-I in two-year-old horses. *J Anim Sci.* 81, 2804–2810.

- Jackson, B.; Eastell, R.; Lanyon, L. E.; Russel, R.G.G.; Price, J.S. (1996) The measurement of bone specific alkaline phosphatase in the horse: A comparison of two techniques. *Research in Veterinary Science*. 61:160-164.
- Jackson, B.F.; Goodship, A.E.; Eastell, R.; Price, J.S. (2003) Evaluation of serum concentrations of biochemical markers of bone metabolism and insulin-like growth factor I associated with treadmill exercise in young horses. *Am J Vet Res*. 64(12):1549-1556.
- Jackson, B. F.; Lonnell, C.; Verheyen, K.L.P.; Dyson, P.; Pfeiffer, D.U.; Price, J.S. (2003) Gender differences in bone turnover in 2-year-old thoroughbreds. *Equine Vet J*. 35(7):702-706.
- Jackson, B. F.; Lonnell, C.; Verheyen, K.L.P.; Wood, J.L.N.; Pfeiffer, D.U.; Price, J.S. (2005) Biochemical markers of bone metabolism and risk of dorsal metacarpal disease in 2-year-old thoroughbreds. *Equine Vet J*. 37(1):87-91.
- Jeffcott, L.B. (1997) Osteochondrosis in the horse. *In Practice*. Feb:64-71.
- Jeffcott, L.B.; Buckingham, S.H.W.; McCarthy, R.N.; Cleeland, J.C.; Scott, E.; McCartney, R.N. (1988) Non-invasive measurement of bone: A review of clinical and research applications in the horse. *Equine Vet J*. (suppl 6):71-79.
- Jeffcott, L.B.; Henson, F.M. (1998) Studies on growth cartilage in the horse and their application to aetiopathogenesis of dyschondroplasia (osteochondrosis). *Vet J* 156:177-192.
- Jensen, R.; Park, R.D.; Lauerman, L.H.; Braddy, P.M.; Horton, D.P.; Flack, D.E.; Cox, M.F.; Einertson, N.; Miller, G.K.; Rehfeld, C.E. (1981) Osteochondrosis in feedlot cattle. *Vet Pathol*. 18:529-535.
- Joffe, P.; Heaf, J.G.; Hyldstrup, L. (1994) Osteocalcin: a non-invasive index of metabolic bone disease in patients treated by CAPD. *Kidney Int*. 46:838-846.
- Jørgensen, B.; Andersen, S. (2000) Genetic parameters for osteochondrosis in Danish Landrace and Yorkshire boars and correlations with leg weakness and production traits. *Anim Sci*. 71:427-434.
- Jørgensen, B.; Arnjberg, J.; Aaslyng, M. (1995) Pathological and radiological investigations on osteochondrosis in pigs, associated with leg weakness. *Zentralbl Veterinärmed A*. 42:489-504.
- Jørgensen, H.S.; Proschowsky, H.; Falk-Ronne, J. *et al.* (1997) The significance of routine radiographic findings with respect to subsequent racing performance and longevity in Standardbred trotters. *Equine Vet J*. 29:55-59.
- Junqueira, L.C.; Carneiro, J. (1995) Tecido ósseo. *In: Histologia Básica*. ed. Junqueira, L.C. & Carneiro, J.; Cap 8. pp. 109-126. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Brasil.
- Kato, M.; Onodera, T. (1987) Early changes of osteochondrosis in medial femoral condyles from rats. *Vet Pathol*. 24:80-86.

- Kneeland, B.J. (1997) Magnetic resonance imaging of articular cartilage and of cartilage degeneration. *In: Magnetic resonance imaging in orthopaedics & sport medicine*, 2nd edition. pp. 83-91. ed: Stoller, D.W., Philadelphia – Lippincott-Raven.
- Krabbe, S.; Christiansen, C.; Rodbro, P.; Transbol, I. (1980) Pubertal growth as reflected by simultaneous changes in bone mineral content and serum alkaline phosphatase. *Acta Paediatr Scand.* 69(1):49-52.
- Kugler, J.H.; Tomlinson, A.; Wagstaff, A.; Ward, S.M. (1979) The role of cartilage canals in the formation of secondary centres of ossification. *J Anat.* 129:493-506.
- LaFond, E.; Breur, G.J.; Austin, C.C. (2002) Breed susceptibility for developmental orthopedic diseases in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 38:467-477.
- Lefebvre, V.; Smits, P. (2005) Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects. Res C Embryo Today.* 75:200-212.
- Lepage, O.M.; Carstanjen, B.; Uebelhart, D. (2001) Non-invasive assessment of equine bone: An update. *The Veterinary Journal.* 161:10-23.
- Lepage, O.M.; Descoteaux, L.; Marcoux, M.; Tremblay, A. (1991) Circadian rhythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. *Can J Vet Res.* 55:5-10.
- Lepage, O.M.; Eicher, R.; Uebelhart, B.; Tschudi, P. (1997) Influence of type and breed of horses on serum osteocalcin concentration and evaluation of the applicability of a bovine RIA and human IRMA to measure the hormone. *Am J Vet Res.* 58:574-578.
- Lepage, O.M.; Hartmann, D.J.; Eicher, R.; Uebelhart, B.; Tschudi, P.; Uebelhart, D. (1998) Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses. *Veterinary Journal.* 156:169-175.
- Lepage, O.M.; Marcoux, M.; Tremblay, A. (1991) Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker of bone metabolism in horses: differences in serum levels with age. *Can J Vet Res.* 54:223-226.
- Lepage, O.M.; Marcoux, M.; Tremblay, A.; Dumas, G. (1992) Sex does not influence serum osteocalcin concentration levels in standardbred horses at different ages. *Can J Vet Res.* 56:379-381.
- Lepage, O.M.; Whitton, C.; Danieli, A.; Niv, Y. (1998) Multi site quantitative ultrasound measurements in horses : preliminary results for metacarpal bone assessment. *Bone.* 23:F214.
- Linkhart, S.G.; Linkhart, T.A.; Taylor, A.K. *et al.* (1993) Synthetic peptide-based immunoassay for amino-terminal propeptide of type I procollagen: application for evaluation of bone formation. *Clin Chem.* 39(11): 2254-2258.
- Ljunggren, G.; Reiland, S. (1969) Osteochondrosis in adolescent animals: an endocrine disorder? *Calcif Tissue Res.* 6 (Suppl) 4:150-151.
- Ljunggren, Ö.; Ljunghall, S. (1992) Carboxyterminal telopeptide of type I collagen, ICTP, as a marker of matrix degradation in neonatal mouse calvarial bones, in vitro. *Biosci Reports.* 12(5):407-11.

- Maroudas, A. (1980) Metabolism of cartilaginous tissues: A quantitative approach. In: *Studies in Joint Disease*. vol 1. ed: Maroudas, A.; Holborrow, E.J. Tunbridge Wells, England. Pitman Medical.
- Martens, P.; Asbjörn, T.; Jon, T. (2000) Identification by computed tomography of radiographically occult lesions of the distal phalanx in a standardbred racehorse. *Equine Practice*. 22:12-15.
- Mathiason-Kochan, K.J.; Potter, G.D.; Michael, E.M. *et al.* (2001) Biochemical markers of bone activity in the juvenile racehorse. *Proceedings- ENPS*.
- McCarthy, R.N.; Jeffcott, L.B. (1992) Effects of exercise on cortical bone in the third metacarpus of young horses. *Rev. Veterinary Science*. 52, 28-37.
- McCarthy, R.N.; Jeffcott, L.B.; McCartney, R.N. (1990) Ultrasound speed in equine cortical bone: Effects of orientation, density, porosity and temperature. *Journal of Biomechanics*. 23:1139-1143.
- McCauley, T.R.; Disler, D.G. (1998) MRI of articular cartilage. *Radiology*. 209:629-640.
- Mcllwraith, C.W. (1996) General pathobiology of the joint and response to injury. In *Joint Disease in the Horse*. Chap 4. pp. 40-69. ed: C.W. Mcllwraith and G.W. Trotter, W.B. Saunders, Philadelphia.
- Mcllwraith, C.W. (2002) Diseases of joints, tendons, ligaments and related structures. In: *Adam's Lameness in Horses*. ed: Stashak, T.S. 5th ed., pp.459-644. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Mcllwraith, C.W. (2005) Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Vet J*. 37(5):473-482.
- Mcllwraith, C.W.; Billinghamurst, R.C.; Frisbie, D.D. (2001) Current and Future Diagnostic Means to Better Characterize Osteoarthritis in the Horse—Routine Synovial Fluid Analysis and Synovial Fluid and Serum Markers. *AAEP Proceedings*. Vol. 47:171-179.
- McIntosh, S.C.; Mcllwraith, C.W. (1993) Natural history of femoropatellar osteochondrosis in three crops of thoroughbreds. *Equine Vet J Suppl*.16:54-61.
- Melkko, J.; Niemi, S.; Risteli, L.; Risteli, J. (1990) Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem*. 36:1328-1332.
- Morgan, J.; Wind, A.; Davidson, A. (1999) Introduction. In: *Hereditary Bone and Joint Diseases en the Dog: Osteochondroses, Hip Dysplasia, Elbow Dysplasia*. pp. 1-19. Schlütersche GmbH & Co. KG Verlag und Druckerei, Hannover, Germany.
- Nakano, T.; Aherne, F.X. (1988) Involvement of trauma in the pathogenesis of osteochondritis dissecans in swine. *Can J Vet Res*. 52:154-155.
- Nakano, T.; Aherne, F.X.; Thompson, J.R. (1979) Effects of feed restriction, sex and diethylstilbestrol on the occurrence of joint lesions with some histological and biochemical studies of the articular cartilage of growing-finishing swine. *Can J Anim Sci*. 59:491-502.
- Nakano, T.; Brennan, J.J.; Aherne, F.X. (1987) Leg weakness and osteochondrosis in swine: a review. *Can J Anim Sci*. 67:883-901.

- O'Callaghan, M. (1991) Future diagnostic methods: a brief look at new technologies and their potential application to equine diagnosis. *Veterinary Clinics of North America – Equine Practice*. 2:467-479.
- O'Donohue, D.D.; Smith, F.H.; Strickland, K.L. (1989) The incidence of osteochondrosis in a Standardbred breeding farm in Quebec, *Proc Am Assoc Equine Pract*. 35: 295.
- Olsson, S.E.; Reiland, S. (1978) The nature of osteochondrosis in animals. Summary and conclusions with comparative aspects on OCD in man. *Acta Radiologica Suppl*. 358:299-306.
- Padgett, G.A.; Mostosky, U.V.; Probst, C.W.; Thomas, M.W.; Krecke, C.F. (1995) The inheritance of osteochondritis dissecans and fragmented coronoid process of the elbow joint in Labrador retrievers. *J Am Anim Hosp Assoc*. 31:327-330.
- Palmer, N; (1993) Bones and Joints. In: *Pathology of Domestic Animals*. pp 4-122. ed: Jubb, K.V.F. and Palmer, N.; 4th edition. Academic Press. San Diego.
- Parfitt, A.M.; Simon, L.S.; Villanueva, A.R.; Krane, S.M. (1987) Procollagen type I carboxy terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res*. 2:427-36.
- Patsama, S.; Rokkanen, P.; Jussila, J. (1975) Etiological factors in osteochondritis dissecans. *Acta Orthop Scandin*. 46:906-918.
- Patterson-Allen, P.; Brautigam, C.E.; Grindeland R. (1982) A specific radioimmunoassay for osteocalcin with advantageous species crossreactivity. *Anal Biochem*. 120:1.
- Pead, M.J.; Skerry, T.M.; Lanyon, L.E. (1988) Direct transformation from quiescence to bone formation in the adult periosteum following a single brief period of loading. *J Bone Miner Res* 3:647-656.
- Philipsson, J. (1996) Pathogenesis of osteochondrosis – genetic implications. In: *Joint Disease in the Horse*. Chap 21. pp. 359-362. ed: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B. Saunders, Philadelphia.
- Pool, R.R. (1993) Difficulties in definition of equine osteochondrosis; differentiation of developmental and acquired lesions. *Eq Vet J. Suppl* 16:5-12.
- Pool, R.R. (1996a) Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries. *Veterinary Clinics of North America – Equine Practice*. 6:1-30.
- Pool, R.R. (1996b) Pathologic manifestations of joint disease in the athletic horse. In: *Joint Disease in the Horse*. Chap 6. pp. 87-103. ed: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B. Saunders, Philadelphia.
- Poole, A.R. (1996) Arthritis research: Some present and future directions in joint disease. In: *Joint Disease in the Horse*. Chap 29. pp. 468-474. ed: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B. Saunders, Philadelphia.

- Poulos, P. (1986) Radiological manifestations of developmental problems. *In: AQHA Developmental Orthopaedic Diseases Symposium*. Amarillo, Texas. American Quarter Horse Association. ed: C.W. McIlwraith. pp.1-2.
- Pratt, G.W. (1980) An in vivo method of ultrasonically evaluating bone strength. *Proceedings 26th Annual Convention of American Association of Equine Practicioners*. 295-301.
- Price, J.S. (1998) Biochemical markers of bone metabolism in horses: potentials and limitations. *The Veterinary Journal*. 156:163-165.
- Price, J.S., Jackson, B.; Eastell, R.; Goodship, A.E.; Blumsohn, A.; Wright, I.; Stoneham, S.; Lanyon, L.E.; Russell; R.G.G. (1995b). Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. *Eq Vet J*. 27:201.
- Price, J.S.; Jackson, B.; Eastell, R.; Wilson, A.M.; Russell, R.G.G.; Lanyon, L.E.; Goodship, A.E. (1995a) The response of the skeleton to physical training: A biochemical study in horses. *Bone*. 17(3):221-227.
- Price, J.S.; Jackson, B.F.; Gray, J.A.; Harris, P.A.; Wright, I.M.; Pfeiffer, D.U.; Robins, S.P.; Eastell, R.E.; Ricketts, S.W. (2001) Biochemical markers of bone metabolism in growing thoroughbreds: a longitudinal study. *Research in Veterinary Science*. 71:37-44.
- Price, J.S.; Jackson, B.; Gray, J. Wright, I.M.; Harris, P.E.; Russell, R.G.G.; Eastell, R.E.; McIlwraith, C.W.; Ricketts, S.W.; Lanyon, L.E.; (1997) Serum levels of molecular markers in growing horses: the effects of age, season and orthopaedic disease. *Proceedings 43rd Annual Meeting Orthopaedic Research Society*. 22:587.
- Price, P.A.; Williamson, M.K.; Lothringer, J.W. (1981) Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J Biol Chem*. 256:12760-12766.
- Rabin, D.S.; Rantanen, N.W.; Seder, J.A.; Miller, P.; Hellhake, P. (1983) The clinical use of bone strength assessment in the thoroughbred racehorse. *Proceeding 28th American Association of Equine Practicioners*. 295-301.
- Ralphs, S.C. (2005) Bilateral stifle osteochondritis dissecans in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc*. 41:78-80.
- Risteli, J.; Elomaa, S.; Trivedi, P.; Mäentausta, O.; Rowe, D.W. (1993) Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone resorption. *Clin Chem*. 39(4):635-40.
- Risteli, L.; Risteli, J. (1994) Metabolism of the procollagen propeptides PICP and PIIINP, indicators of collagen synthesis. *Hormones Markers*. 9:2-3.
- Rosal, T.J.; Capen, C.C. (1997) Biochemical markers of bone metabolism. *In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Cap 23. pp. 672-674. ed: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W. and Bruss, M.L., Academic Press..
- Rossdale, P.D.; Hopes, R.; Wingfield Digby, N.J.; Offord, K. (1985) Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *The Veterinary Record*. 116:66-69.

- Rubin, C.T.; Lanyon, L.E. (1984) Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg* 66A:308-314.
- Sandgren, B. (1988) Bony fragments in the tarsocrural and metacarpo- or metatarsophalangeal joints in the Standardbred horse: a radiographic survey. *Equine Vet J* 6(Suppl):66-70.
- Sandgren, B.; Dalin, G.; Carlsten, J. (1993) Osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints in Standardbred trotters. I. *Epidemiol Equine Vet J* 16(Suppl):31-37.
- Savage, C.J.; McCarthy, R.N.; Jeffcott, L.B. (1993) Effects of dietary phosphorus and calcium on induction of dyschondroplasia in foals. *Equine Vet J Suppl.* 16:80.
- Schougaard, H., Falk Rønne, J.; Phillipson, J. (1990) A radiographic survey of tibiotarsal osteochondrosis in a selected population of trotting horses in Denmark and its possible genetic significance. *Equine Vet J.* 22:288-289.
- Seeherman, H.J. (1998) Clinical applications of bone scanning. In: *Current Techniques in Equine Surgery and Lameness*. pp. 592-605. 2nd edition. ed: White & Moore, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Seibel, M.J. (2000) Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int.* 6:S18-29.
- Shavers, J.R.; Fretz, P.B.; Doige, C.E., *et al.* (1979) Skeletal manifestations of suspected hypothyroidism in two foals. *J Equine Med Surg.* 3:269.
- Sintzoff, S.; Sintzoff, J.R.; Blum, A. *et al.* (1999) Imagerie du cartilage: Etat actuel et perspectives. *Journal Radiologie.* 80:677-678.
- Skerry, T.M.; Bitensky, L.; Chayen, I.; Lanyon, L.E. (1989) Early strainrelated changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res.* 4:793-788.
- Stern, S.; Lundeheim, N.; Johansson, K.; Andersson, K. (1995) Osteochondrosis and leg weakness in pigs selected for lean tissue growth rate. *Livestock Production Science.* 44:45-52.
- Strömberg, B.; Rejnö, S. (1978) Osteochondrosis in the horse I. A clinical and radiologic investigation of osteochondritis dissecans of the knee and hock joint. *Acta Radiol Suppl.* 358 :139.
- Tapprest, J.; Audigié, F.; Radier, C. *et al.* (2003) Magnetic resonance imaging for the diagnosis of stress fractures in a horse. *Veterinary Radiology & Ultrasound.* 44(4):438-442.
- Todhunter, R.J. (1996) Anatomy and physiology of synovial joints. In: *Joint Disease in the Horse*. Chap 1. pp.1-28. ed: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B. Saunders, Philadelphia.
- Trivedi, P.; Risteli, J.; Risteli, L. *et al.* (1991) Serum concentrations of the type I and III procollagen propeptides as biochemical markers of growth velocity in healthy infants and children and in children with growth disorders. *Pediatr Res.* 30(3):276-80.

Uebelhart, D.; Delmas, P.D. (1993) Les dosages des molécules de pontage du collagène (pyridinolines) dans l'étude de la dégradation du tissu osseux et du cartilage articulaire. *Pathologie et Biologie*. 41:951-961.

Uebelhart, D.; Demiaux-Domenech, B.; Roth, M. *et al.* (1995) Bone metabolism in spinal cord injured individuals and in others who have prolonged immobilisation. A review. *Paraplegia*. 33:669-673.

Valentino, L.W.; Lilich, J.D.; Gaughan, E.M. *et al.* (1999) Radiographic prevalence of osteochondrosis in yearling feral horses. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 12:151-155.

van de Wal, P.G.; van der Valk, P.C.; Goedegebuure, S.A.; van Essen, G. (1980) Osteochondrosis in six breeds of slaughter pigs. II. Data concerning carcass characteristics in relation to osteochondrosis. *Vet Q*. 2:42-47.

van Weeren, P.R.; (2005) Osteochondrosis. *In: Equine Surgery*. pp. 1166-1178. 3rd edition, ed. Auer, J.A. and Stick, J.A., W.B. Saunders..

van Weeren, P.R.; Barneveld, A. (1999a) Study design to evaluate the influence of exercise on the development of the musculoskeletal system of foals up to age 11 months. *Equine Vet J. Suppl*. 31:4-8.

van Weeren, P.R.; Barneveld, A. (1999b) The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal. *Equine Vet J. Suppl*. 31:16-25.

van Weeren, P.R.; Brama, P.A.J. (2003) Equine joint disease in the light of new developments in articular cartilage research. *Pferdeheilkunde*. 19:336.

Veen, G.V.D.; Kingmans, J.; van Veldhuizen, A.E.; van de Watering, C.C.; Barneveld, A.; Dik, K.J.; van der Meij, G.J.W.; van de Belt, A.J. (1994) The frequency and heritability of navicular disease, sesamoidosis, fetlock joint arthrosis, bone spavin, osteochondrosis of the hock: a radiographic progeny study. Internal report: Koninklijk Warmbloed Paardenstamboek Nederland. P 17.

Vervuert, I.; Coenen, M.; Wedemeyer, U.; Harmeyer, J. (2002) Biochemical markers of bone activity in young standardbred horses during different types of exercise and training. *J Vet Med A*. 49:396-402.

Verzijl, N.; DeGroot, J.; Thorpe, S.R. *et al.* (2000) Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 275:39027.

Voûte, L.C.; Henson, F.M.D.; Platt, D. *et al.* (1997) Lesions of the lateral trochlear ridge of the distal femur in ponies with histological features of equine dyscondroplasia. *Proc Brit Equine Vet Assoc*. 36:153.

Wasserman R.H. Bones. *In: Dukes' Physiology of Domestic Animals*. Cap.32. pp. 467-485. 10th edition.

Widmer W.R.; Buckwalter, K.A.; Fessler, J.F. *et al.* (2000) Use of radiography, CT and MRI for evaluation of navicular syndrome in the horse. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 41:108-116.

Wolff, J. (1892) Das gesetz der transformation der knochen. Berlin. Hirschwald.

Woodard, J.C.; Becker, H.N.; Poulos, P.W. Jr. (1987) Effect of diet on longitudinal bone growth and osteochondrosis in swine. *Vet Pathol.* 24:109-117.

Yazdi, M.H.; Lundeheim, N.; Rydhmer, L.; Ringmar-Cederberg, L.; Johansson, K. (2000) Survival of Swedish Landrace and Yorkshire sows in relation to osteochondrosis: a genetic study. *Anim Sci.* 71:1-9.

Young, D.R.; Richardson, D.W.; Markel, M.D.; Nunamaker, D.M. (1989) Mechanical and morphometric analysis of the third carpal bone of thoroughbreds. *Am J Vet Res.* 52:402-409.

Ytrehus, B.; Carlson, C.S.; Ekman, S. (2007) Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. *Vet Pathol.* 44: 429-448.

Ytrehus, B.; Carlson, C.S.; Lundeheim, N.; Mathisen, L.; Reinholt, F.P.; Teige, J.; Ekman, S. (2004) Vascularisation and osteochondrosis of the epiphyseal growth cartilage of the distal femur in pigs-development with age, growth rate, weight and joint shape. *Bone.* 34:454-465.

Ytrehus, B.; Ekman, S.; Carlson, C.S.; Teige, J.; Reinholt, F.P. (2004) Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. *Bone.* 35:1294-1306.