

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**MÉTODO ALTERNATIVO DE SUBSTITUIÇÃO DO LIGAMENTO
CRUZADO CRANIAL UTILIZANDO FÁSCIA LATA E DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS PARA PREVENÇÃO DE DOENÇA
ARTICULAR DEGENERATIVA EM CÃES**

NATÁLIA SIGNORELLI MACIEL

VILA VELHA

MARÇO / 2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**MÉTODO ALTERNATIVO DE SUBSTITUIÇÃO DO LIGAMENTO
CRUZADO CRANIAL UTILIZANDO FÁSCIA LATA E DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS PARA PREVENÇÃO DE DOENÇA
ARTICULAR DEGENERATIVA EM CÃES**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

NATÁLIA SIGNORELLI MACIEL

VILA VELHA

MARÇO / 2014

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M152m Maciel, Natália Signorelli.

Método alternativo de substituição do ligamento cruzado cranial utilizando fásia lata e de células tronco mesenquimais para prevenção de doença articular degenerativa em cães / Natália Signorelli Maciel. – 2014.

50 f.:il.

Orientador: Betânia Souza Monteiro.

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Cão. 2. Articulações. 3. Articulações – doenças - tratamento. 4. Células-tronco. I. Monteiro, Betânia Souza. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.708960252

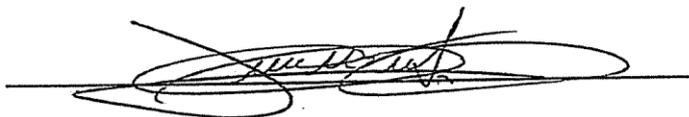
NATÁLIA SIGNORELLI MACIEL

**MÉTODO ALTERNATIVO DE SUBSTITUIÇÃO DO LIGAMENTO
CRUZADO CRANIAL UTILIZANDO FÁSCIA LATA E DE
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PARA PREVENÇÃO DE
DOENÇA ARTICULAR DEGENERATIVA EM CÃES**

Dissertação apresentada a Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciência
Animal, para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 10 de março de 2014.

Banca Examinadora



Kelly Cristine de Sousa Pontes (UNIVIÇOSA)



Vinicius Ricardo Cunha de Souza (UWV)



Betania Souza Monteiro (UWV) (Orientadora)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Jones Spalenza Maciel e Liana
Signorelli Maciel! Essa conquista é de vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, autor e consumidor da minha fé! Obrigado Senhor por me dar força, sabedoria e paz no coração! Muitas vezes necessárias!!!

Aos meus pais, Jones Spalenza Maciel e Liana Signorelli Maciel, por todo amor, carinho, apoio e acalento! Pelos esforços que sempre fizeram e fazem para meus estudos. Obrigada por entenderem e aceitarem minha ausência frequente durante esses dois anos!!!

À minha irmã, Ana Carolina Signorelli Maciel, pela amizade, compreensão pela ausência e por existir em minha vida!!!

Ao meu namorado, Luiz Fernando Calhau de Figueiredo, pelo amor, carinho, companheirismo e apoio. Por me alegrar nos momentos ruins e por me ajudar a cuidar dos cães em plenos finais de semana. Com você foi bem mais fácil!!!

A toda minha família (avós, tios, primos), por toda ajuda e incentivo que sempre me deram!

À minha segunda família, Luiz Paulo Figueiredo, Marcela Calhau de Figueiredo, Paulo Cavalcanti de Albuquerque Figueiredo Neto e Mariana Calhau de Figueiredo, pelo apoio de vocês!

À minha orientadora e professora Betânia Souza Monteiro, por ter me aceito como orientada e por me conduzir neste estudo durante os dois anos!

Aos demais professores do Programa de Mestrado em Ciência Animal que fizeram parte dessa jornada!

À Flavia Bitti e Luiz Francisco Riodades (Chiquinho). Vocês foram essenciais nesse projeto. Obrigada pela ajuda e companhia de vocês!

À professora Flávia Machado, obrigada pela ajuda com as radiografias e interpretações dos laudos!

Aos funcionários do Hospital Veterinário, em especial a Terezinha Braga, Robson Borges, Lurdinha e tia Lúcia; obrigada pela amizade e carinho de vocês. Agradeço imensamente ao Jukleber, sempre disposto ajudar no que fosse preciso e pelo cuidado e carinho que sempre teve com os animais!

Aos estagiários do Laboratório de Células Tronco e Terapia Celular (LCET-UVV), pela ajuda com os animais!

Ao meu mestre e amigo Gustavo Cancian Bajotto, pelos conselhos e ensinamentos!

Às minhas amigas, Fernanda Lemos e Laura Conti, por compartilharem comigo dessa caminhada. Obrigada pela ajuda e apoio de vocês sempre!

À Fundação de Amparo as Pesquisas do Espírito Santo (FAPES) que me concedeu a bolsa de mestrado!

À empresa RAÇÕES BOLZANI LTDA, em especial aos Médicos Veterinários Jazyr Bolzani Júnior e Caio Arruda, pela doação de 400 kg de ração para os animais do estudo. Obrigada pela parceria e pela confiança na pesquisa!

Aos cães, utilizados nesse experimento, obrigada pela alegria e amor sempre demonstrados.

Agradeço a todos que, de alguma forma, me ajudaram durante esses dois anos e que sempre torceram por mim. Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1 ANIMAIS.....	6
2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	7
2.3 COLETA DE TECIDO ADIPOSEO E CULTURA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....	7
2.3.1 Indução de diferenciação osteogênica em culturas de CTMs	10
2.3.2 Caracterização fenotípica.....	10
2.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO PARA A ARTROTOMIA.....	11
2.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO – ARTROTOMIA E SUBSTITUIÇÃO DO LCCr	11
2.6 TRATAMENTOS PÓS-OPERATÓRIO - APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS (CTM) X APLICAÇÃO DE SOLUÇÃO TAMPÃO SALINA FOSFATO (PBS).....	18
2.7 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS.....	19
2.8 AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA	20
2.9 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	21
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

MACIEL, Natália Signorelli; MSc.; Universidade Vila Velha – ES, Março de 2014. Método Alternativo de Substituição do Ligamento Cruzado Cranial Utilizando Fásia Lata e de Células Tronco Mesenquimais para Prevenção de Doença Articular Degenerativa em Cães. Orientadora: Betânia Souza Monteiro.

RESUMO

O ligamento cruzado cranial (LCCr) é responsável por limitar a rotação interna da tíbia ao flexionar o membro, limitar o deslocamento cranial da tíbia em relação ao fêmur e evitar hiperextensão da articulação. A ruptura de ligamento cruzado cranial (RLCCr) é uma das causas mais comuns de claudicação em cães. O diagnóstico é obtido no exame físico pelo teste de gaveta cranial e compressão tibial, e por exames de imagem. Como tratamento, a correção cirúrgica é o mais indicado, podendo utilizar diferentes tipos de técnicas cirúrgicas. Um ponto ainda não elucidado é sobre a progressão da osteoartrose após a cirurgia. Com os avanços da medicina, muito se estuda sobre o uso de células tronco mesenquimais para a prevenção e tratamento de doenças articulares. O presente estudo teve por objetivo propor uma técnica de substituição de LCCr capaz de promover a estabilização da articulação do joelho e impedir o aparecimento e progressão de doença articular degenerativa. Foram utilizados 8 cães, adultos jovens com peso entre 10,0-15,0 quilos, divididos em grupo 1 (G1-PBS) e grupo 2 (G2-CTM). Após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial, um enxerto de fásia lata foi criado para substituir o ligamento, passando esse por um túnel na crista da tíbia, por dentro da articulação e por fim, fixado no côndilo femoral com auxílio de um parafuso e arruela de aço inoxidável. O G2 recebeu 48 horas após a cirurgia, aplicação de células tronco mesenquimais intra-articular, enquanto o G1 recebeu solução tampão salina fosfato. Os animais foram acompanhados durante 60 dias pós-operatório, realizando exercícios fisioterápicos e durante todo o pós-operatório os animais passaram por avaliações de dor, edema, claudicação, teste de gaveta e avaliação radiográfica da articulação do joelho quanto à presença ou ausência de doença articular degenerativa (DAD). A técnica proposta foi capaz de restabelecer a estabilização articular, mas não impede a progressão da doença articular degenerativa e o uso de células tronco mesenquimais foi satisfatório para prevenção da ocorrência de osteoartrose.

Palavras-chave: movimento de gaveta, claudicação, doença articular degenerativa.

MACIEL, Natália Signorelli; MSc.; Universidade Vila Velha – ES, March 2014. Alternative method of repair of the cranial cruciate ligament using fascia lata and mesenchymal stem cells for the prevention of degenerative joint disease in dogs. Teacher Advisor: Betânia Souza Monteiro.

ABSTRACT

Rupture of the cranial cruciate ligament (RLCCr) is common causes of lameness in dogs. This ligament is responsible for limiting internal rotation of the tibia to flex the limb, limit the cranial displacement of the tibia relative to the femur and avoid hyperextension of the joint. Diagnosis is made on physical examination, cranial drawer and tibial compression tests, and imaging evaluation. Surgical correction is the most appropriate as a treatment, may use different types of surgical techniques. A point is not yet elucidated on the progression of osteoarthritis after surgery. With advances in medicine, much studies about the use of mesenchymal stem cells for the prevention and treatment of joint diseases. This study aimed to propose a technique of replacing LCCR able to stabilize the knee joint and prevent the progression of degenerative joint disease. Eight dogs, young adults, weighing between 10.0 -15.0 pounds, divided into group 1 (G1-PBS) and group 2 (G2-CTM) were used. After the experimental rupture of the cranial cruciate ligament, fascia lata graft was created to replace the ligament, passing it through a tunnel in the tibial crest, inside the joint and finally fixed in the femoral condyle with the aid of a screw and washer stainless steel. In animals of G2, 48 hours after surgery, intra-articular application of mesenchymal stem cells were application, while the G1 received phosphate buffered saline intra-articular. The animals were followed for 60 postoperative days, performing physical therapy exercises for knee extension and flexion exercises on physiotherapy balls and walks with frequent climbs stairs and ramp during the day. Throughout all the postoperative period, the rats were assessments of pain, edema, claudication, drawer test and radiographic evaluation of the knee joint for the presence or absence of degenerative articular disease (DAD). The proposed technique was able to restore joint stabilization, but does not prevent the progression of degenerative articular disease and the use of mesenchymal stem cells was satisfactory for prevention of osteoarthritis.

Keywords: drawer movement, lameness, degenerative articular disease.

1. INTRODUÇÃO

A ruptura de ligamento cruzado cranial (RLCCr) é uma das causas mais comuns de claudicação em cães (Vasseur, 1998; Harasen, 2002; Modenato et al., 2005; Kipfer et al., 2008; Dymond et al., 2010), acometendo qualquer raça, sexo e idade (Johnson e Hulse, 2005).

Esse ligamento é responsável por limitar a rotação interna da tíbia ao flexionar o membro, limitar o deslocamento cranial da tíbia em relação ao fêmur e evitar hiperextensão da articulação. Com a sua ruptura ocorre instabilidade da articulação do joelho (Johnson e Hulse, 2005).

Geralmente as causas da ruptura do LCCr são traumáticas (Vasseur, 1998), mas também podem decorrer de degenerações, associadas ao envelhecimento (Johnson e Hulse, 2005) acometendo ambos os joelhos.

O principal sinal clínico apresentado na RLCCr é a claudicação sem sustentação do peso em casos agudos e claudicação leve com sustentação do peso em casos crônicos de RLCCr (Vasseur, 1998; Johnson e Hulse, 2005). Outros sinais que podem ser encontrados são efusão articular, espessamento palpável da cápsula articular e atrofia muscular do membro acometido (Shires et al., 2008).

O diagnóstico de RLCCr deve começar com exame ortopédico minucioso. Em casos de ruptura crônica, os pacientes podem apresentar a musculatura femoral atrofiada em relação ao membro contralateral (Harasen, 2002; Johnson e Hulse, 2005) e, tanto em casos crônicos quanto casos agudos, podem-se observar

espessamento da cápsula articular medial (Vasseur, 1998), além de crepitação da articulação durante extensão e flexão do membro (Johnson e Hulse, 2005), de derrame articular e de fibrose periarticular (Harasen, 2002).

O diagnóstico definitivo para a RLCCr é dado com o teste de gaveta cranial. Com o paciente em decúbito lateral e o membro a ser examinado para cima, o examinador posiciona um polegar atrás da fabela e o indicador sobre a patela, e com o outro polegar na cabeça da fíbula e o indicador sobre a crista da tíbia, estabilizando o fêmur e movimentando a tíbia cranialmente. O teste é positivo quando a tíbia movimenta-se cranialmente em relação ao fêmur (Harasen, 2002; Johnson e Hulse, 2005), indicando a ruptura do ligamento cruzado.

Outro teste é o de compressão tibial, feito com o animal em estação ou em decúbito lateral, onde o examinador flexiona a articulação tibio-társica-metatársica do paciente com uma das mãos e com a outra posiciona o indicador sobre a crista da tíbia para verificar o movimento cranial (Harasen, 2002 e Schulz, 2008)

Exames de imagens são complementares no diagnóstico de RLCCr (Harasen, 2002; Oliveira et al., 2009). Em casos de ruptura aguda do ligamento, a radiografia é importante para descartar outras causas de claudicação (Schulz, 2008). Já em casos de ruptura crônica, os achados radiográficos mais comuns incluem a presença de osteófitos, perda de definição do coxim gorduroso e deslocamento cranial da tíbia (Johnson e Hulse, 2005; Oliveira et al., 2009). Já os achados ultrassonográficos incluem derrame articular, coxim gorduroso heterogêneo e inserção de ligamento cruzado com aspecto hiperecogênico e irregular (Oliveira et al., 2009), sugerindo ruptura.

Como diagnósticos diferenciais ou em associação podem ser incluídos luxação de patela, lesão meniscal, artrite e torções articulares (Johnson e Hulse, 2005).

Como tratamento, pode-se instituir o clínico conservativo, sendo mais recomendando para animais com menos de 10 kg de peso corpóreo. Entretanto, a terapia cirúrgica é a mais indicada independente do tamanho do animal, visando a recuperação da função ideal do membro (Johnson e Hulse, 2005). Várias são as técnicas possíveis para alcançar a estabilização do joelho, como as técnicas intra e extracapsulares. A escolha da técnica depende da idade, do porte e do peso do animal (Vasseur, 1998), como também da preferência do cirurgião (Johnson e Hulse, 2005).

As técnicas extracapsulares consistem na colocação de suturas externas a articulação, e as técnicas intracapsulares consistem na utilização de tecido autógeno, passando por entre a articulação pelo método “over the top” ou por túneis feitos na tíbia e fêmur (Johnson e Hulse, 2005).

Nos últimos anos, técnicas de osteotomias foram surgindo, focadas na biomecânica da articulação, com intuito de neutralizar a função do ligamento e não de restaurar sua função (Modenato et al., 2005; Boudrieau, 2009), como o avanço da tuberosidade da tíbia (TTA) e osteotomia de nivelamento do platô tibial (TPLO).

Sabe-se que a instabilidade articular leva ao desenvolvimento da doença articular degenerativa/osteoartrose (Johnson e Hulse, 2005; Borges et al., 2008), caracterizada pela degradação enzimática da cartilagem, esclerose do osso subcondral e formação de osteófitos (Borges et al., 2008; Vézina-Audette et al.,

2013). A evolução da osteoartrose após a cirurgia é um ponto negativo, que ainda não está bem elucidada (Modenato et al., 2005), sendo a resposta aos tratamentos um desafio constante (Borges et al., 2008).

Com os avanços na medicina, o uso de células tronco mesenquimais (Queiroz et al., 2009; Coleman et al., 2010; Cristante e Narazaki, 2011) vem sendo estudado em terapias diversas incluindo a prevenção e tratamento de doenças articulares. Na ortopedia e traumatologia humana, as células tronco embrionárias e somáticas são usadas na formação de novos tecidos (Cristante e Narazaki, 2011). Essas células também estão sendo estudadas a fim de ajudar na formação/recuperação da cartilagem articular (Cristante e Narazaki, 2011), visando à regeneração da camada superficial da cartilagem e o retardo na progressão da osteoartrose (Coleman et al., 2010). Por possuírem grande disponibilidade e um preparo acessível, representam um importante papel na reparação de tecido (Coleman et al., 2010).

As células tronco mesenquimais são células adultas, multipotentes, encontradas em regiões perivasculares, medula óssea, tecido adiposo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos e, por apresentarem grande capacidade de autorrenovação e diferenciação em vários tipos celulares são muito eficazes como fonte de terapia celular (Parreira e Resende, 2013; Pinto Filho et al., 2013). Elas destacam-se por possuírem características imunossupressoras e imunomoduladoras que secretam grande quantidade e variedade de mediadores pró-inflamatórios, que auxiliam na modulação da reação inflamatória, proporcionando uma reparação tecidual (Nauta e Fibbe, 2007; Monteiro et al., 2009).

O modo de ação das células tronco mesenquimais, no tratamento da osteoartrose, ainda é controverso, mas estudos revelam que o efeito terapêutico dessas células está relacionado aos seus efeitos paracrinos (Coleman et al., 2010).

Considerando a grande demanda de casos de ruptura de ligamento cruzado cranial e a posterior ocorrência de osteoartrose, o presente estudo teve como objetivo propor uma técnica de substituição de LCCr capaz de promover a estabilização da articulação do joelho, auxiliar na biomecânica do membro e impedir a progressão de doença articular degenerativa/osteoartrose, verificando as diferenças encontradas entre os grupos e avaliando se a utilização de células tronco implicou na não ocorrência de doença articular degenerativa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal (CEUA) da Universidade Vila Velha (Protocolo nº 253-2013).

2.1 ANIMAIS

Utilizaram-se oito cães adultos jovens, sem raça definida, sendo um macho e sete fêmeas, com peso entre 10–15 quilos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Vitória.

Os cães passaram por um período de adaptação de 30 dias, em canis individuais do Hospital Veterinário “Professor Ricardo Alexandre Hippler” da Universidade Vila Velha (UVV), recebendo ração comercial balanceada e água “*ad libitum*”. Eram realizados passeios diários com os animais, em coleira, duas vezes por dia, durante todo o período experimental.

Anteriormente ao ato cirúrgico, todos os cães foram vermifugados, vacinados com vacinas antirrábica e polivalente contra doenças infectocontagiosas, e submetidos a exames físico e laboratorial (hemograma completo, uréia, creatinina). Ademais, para descartar alterações articulares pré-existentes, foram realizados exames ortopédicos e radiográficos das articulações femorotibiopatelares, sendo a ausência de alterações o critério de inclusão do animal no estudo.

Os animais alocados na pesquisa tiveram a deambulação filmada anteriormente ao ato cirúrgico, com auxílio de máquina fotográfica digital. Durante a condução dos animais, os mesmos eram contidos por meio de coleiras cervicais e o condutor os conduzia por um piso regular e plano, num trecho reto de aproximadamente 15 metros de ida e de volta. O mesmo padrão de filmagem foi mantido nos exames pós-operatórios, objetivando verificar a marcha do animal.

2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

No ato da inclusão dos animais no estudo, os cães foram divididos, por meio de sorteio, em dois grupos experimentais e também determinada à ordem da realização das cirurgias. Quatro animais (denominados de 1 a 4) foram alocados no grupo Solução Tampão Salina Fosfato (PBS) (G1) e outros quatro animais (denominados de 5 a 8) foram alocados no grupo Células Tronco Mesenquimais (CTM) (G2).

Os animais pertencentes ao G2 foram submetidos à coleta de tecido adiposo para cultivo de células tronco mesenquimais, 15 dias antes da realização da cirurgia experimental. O cultivo de células-tronco mesenquimais e o preparo do PBS foram produzidos pelo Laboratório de Células Tronco e Terapia Celular da UVV (LCET-UVV).

2.3 COLETA DE TECIDO ADIPOSEO E CULTURA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

Quinze dias antes da realização da cirurgia articular, cada um dos 4 animais pertencentes ao G2 foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas, sedação

utilizando morfina (0,5 mg/kg, IM) e acepromazina (0,03 mg/kg, IM). Após 15 minutos, eram cateterizados na veia cefálica esquerda, de forma percutânea, e a anestesia induzida com propofol na dose de 4,0 mg/kg, intravenoso, até que os animais apresentassem condições adequadas para a intubação e manutenção anestésica com isoflurano diluído em 100% de oxigênio, permitindo assim a coleta de tecido adiposo. Em ambiente cirúrgico e por meio de técnicas assépticas, aproximadamente 1,0 cm³ (1,0 grama) de tecido adiposo foi coletado da região inguinal. As amostras de tecido foram depositadas em Tubo Falcon 50 contendo 20,0 mL de meio de cultura celular DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) acrescido de SFB (Soro Fetal Bovino) em temperatura ambiente. O tubo foi identificado com o nome do animal e a identificação se manteve nas garrafas de cultura para assegurar o transplante autógeno.

No LCET, em capela de fluxo, o meio DMEM foi removido do tubo e as amostras de tecido adiposo foram lavadas utilizando PBS na diluição 1x. Na sequência, o tecido adiposo foi removido do tubo e transferido para um segundo tubo contendo 20,0 mL de solução de colagenase tipo I. As amostras foram fragmentadas em pequenos pedaços para acelerar o processo de lise e permaneceram nessa solução durante 45 minutos, incubadas em estufa a 37° C. Transcorrido o tempo de 45 minutos, o tubo foi centrifugado durante 10 minutos a 694G (2000 rpm). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 10,0 mL de PBS e novamente centrifugado (Lemos, 2008 e Nogueira, 2009).

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuscitado em 15,0 mL de DMEM completo, que posteriormente foi dividido em frações de 5,0 mL da solução celular, transferida para três garrafas de cultura celular de 75,0 cm². O

volume de solução das garrafas foram acrescentados com 15,0 mL de DMEM completo, e as garrafas foram mantidas em estufa incubadora à 37° C em 5% de CO₂ e umidade de 95%. As células foram monitoradas, diariamente, em microscópio invertido de contraste de fase, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 a 3 dias, de acordo com o metabolismo celular (Lemos, 2008 e Nogueira, 2009).

Após permanecerem em estufa, quando foi identificada a confluência de 80%, o meio de cultura foi totalmente desprezado e a cultura foi tripsinizada (Tripsina-EDTA 1x) e incubada a 37° C, durante 5 minutos. Após esse período, inativou-se a ação da tripsina com acréscimo de meio DMEM completo. A solução foi transportada para um tubo de centrifuga e centrifugada à temperatura de 22° C e 694G (2000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi totalmente desprezado e o *pellet* ressuspendido em meio DMEM completo, e novamente dividido em garrafas de cultura, na proporção 1:2 (cada garrafa formava duas novas garrafas). A cada nova confluência de 80% o procedimento era novamente realizado até atingir a quarta passagem celular (Lemos, 2008 e Nogueira, 2009).

Três garrafas de cultura contendo as células da quarta passagem foram mantidas incubadas a 37° C para registro fotográfico da morfologia *in vitro* em microscópio invertido, indução da diferenciação osteogênica e para realização da imunofenotipagem por citometria de fluxo.

As demais garrafas de cada paciente foram submetidas à etapa de tripsinização e amostras das células foram contadas e avaliadas quanto à viabilidade celular utilizando a técnica de Azul de Tripan. As células foram aliqüotadas em seringas de 1,0 mL contendo o mínimo de 10⁶ células diluídas em 0,5 mL de PBS, e

imediatamente transportadas para o centro cirúrgico, para a realização do transplante.

2.3.1 Indução de diferenciação osteogênica em culturas de CTM

Uma garrafa de cultura contendo as células da quarta passagem foi tripsinizada e repicada em seis poços de uma placa de crescimento. O meio de cultura de três poços foi enriquecido com 10^{-8} mol/mL de dexametasona, 5,0 µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato, 10,0 mmol/L de β-glicerofosfato e incubado a 37° C por quatro semanas. Os três poços restantes foram mantidos como controle, contendo apenas o meio DMEM completo.

Ao término deste período, os poços da garrafa de cultura foram lavados em PBS e corados durante cinco minutos com vermelho de Alizarina à temperatura ambiente, lavados com água destilada e observados em microscópio óptico quanto à deposição de cálcio (Lemos, 2008 e Nogueira, 2009).

2.3.2 Caracterização fenotípica

Uma garrafa de cultura contendo as células da quarta passagem foi tripsinizada, ressuspensa em 1,0 mL de PBS e plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/poços em uma placa de crescimento com 96 poços. As amostras foram caracterizadas por imunofenotipagem por meio da incubação com anticorpos anti-CD90, CD29, CD45 e CD34 e processadas em citômetro de fluxo FACScan (Fluorescence Activated Cell Analyser) empregando-se o software Cell Quest. Essa etapa foi realizada em parceria com o Laboratório Imunogenética Celular e Molecular, da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO PARA A ARTROTOMIA

Após jejum alimentar de 12 horas sem restrição hídrica, os animais foram cateterizados na veia cefálica esquerda, de forma percutânea e a anestesia induzida com propofol na dose de 7,0 mg/kg, intravenoso até que os animais apresentassem condições adequadas para a intubação (perda do reflexo interdigital e palpebral). A intubação foi realizada com sonda endotraqueal com cuff, conectada a um circuito circular valvular para o fornecimento de isoflurano diluído em 100% de oxigênio. A concentração expirada de isoflurano (ET_{ISO}) foi ajustada de forma a manter plano moderado de anestesia de acordo com julgamento clínico. Para complementar a analgesia intra-operatória e garantir conforto no pós-operatório imediato, foi realizada a anestesia peridural lombossacra com a associação de metadona (0,5 mg/kg) e bupivacaína 0,125% (0,25 ml/kg) com vasoconstritor. O procedimento cirúrgico foi iniciado após 10 minutos da peridural. O acesso venoso também foi utilizado para a administração de cefazolina (30,0 mg/kg) e meloxicam (0,2 mg/kg) imediatamente antes do início da cirurgia, e instituição de fluidoterapia com solução de Ringer com Lactato na taxa de 10,0 mL/kg/h durante todo o período intra-operatório.

2.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO – ARTROTOMIA E SUBSTITUIÇÃO DO LCCr

Após a tricotomia do membro pélvico direito, estendendo-se da articulação coxofemoral até articulação társica, os animais foram posicionados em mesa cirúrgica, em decúbito lateral esquerdo e com o membro direito para cima. Foi realizada antisepsia da região tricotomizada com Clorexidine alcoólico 2% e o campo cirúrgico foi posicionado.

Procedeu-se a incisão de pele craniolateral, de aproximadamente 17,0 cm, estendendo-se do trocânter maior do fêmur até a tuberosidade da tíbia (crista da tíbia). O tecido subcutâneo foi dissecado até a visualização completa do músculo da fáscia lata. A porção média da fáscia lata foi dissecada, com auxílio de bisturi cirúrgico (cabo número 3 e lâmina número 10), confeccionando um retalho de aproximadamente 1,5 cm de largura, que se estendia do trocânter maior do fêmur até o limite distal da tuberosidade tibial (crista da tíbia), sobre a cápsula articular e paralelamente ao tendão patelar (Figura 1A).

A porção proximal do retalho foi seccionada e presa a uma pinça hemostática, e o restante divulsionado da musculatura (Figura 1B) até a porção distal, que foi mantida fixa. O restante da fáscia lata foi suturada com fio poliglactina 910 (2-0) em padrão de sutura simples contínuo.

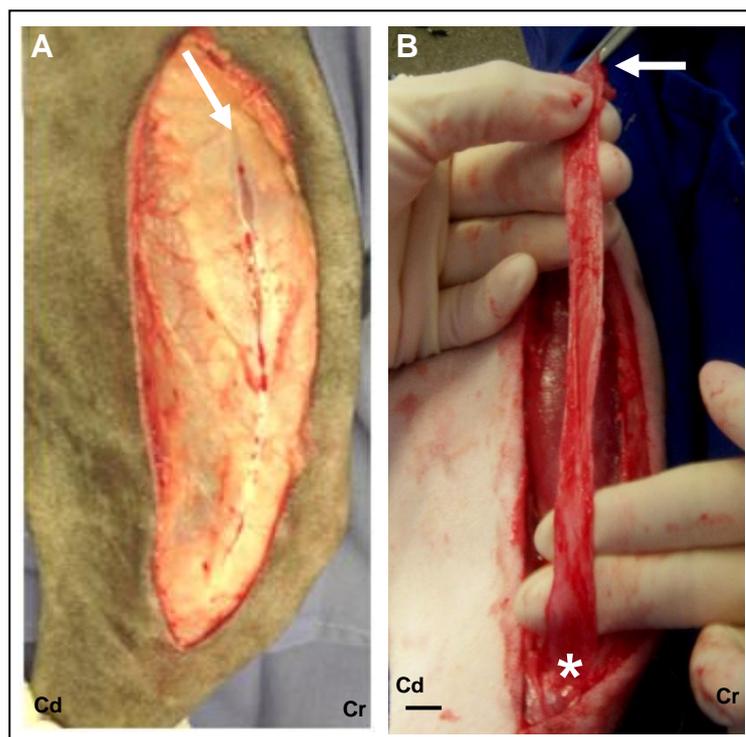


Figura 1: Imagens fotográficas do acesso cirúrgico realizado para a confecção do enxerto de fáscia lata para substituição do ligamento cruzado cranial. **A)** Incisão cutânea estendendo-se do trocânter maior do osso fêmur até porção distal da tuberosidade da tíbia. Nota-se o início da confecção do retalho (seta) pela incisão da fáscia. **B)** A porção média da fáscia lata foi dissecada, confeccionando um retalho de aproximadamente 1,5 cm de largura. A porção proximal do retalho foi seccionada e presa a uma pinça hemostática (seta) e o restante divulsionado da musculatura, até a porção distal (*), que foi mantida fixa. (escala = 1,0 cm; Cd = caudal; Cr = cranial).

A porção proximal do retalho, por meio da pinça hemostática foi submetida à torção sobre o próprio eixo, no sentido horário, confeccionando o enxerto para substituição do ligamento cruzado cranial (Figura 2A). Após a confecção do enxerto, prosseguiu-se a técnica com a criação de um túnel ósseo na crista da tíbia (entre a tuberosidade da tíbia e a tíbia), por meio da perfuração transcortical utilizando broca ortopédica de 4,0 mm acoplada em furadeira autoclavável (Figura 2B), para passagem do enxerto da porção lateral do membro para a porção medial (Figura 2C).

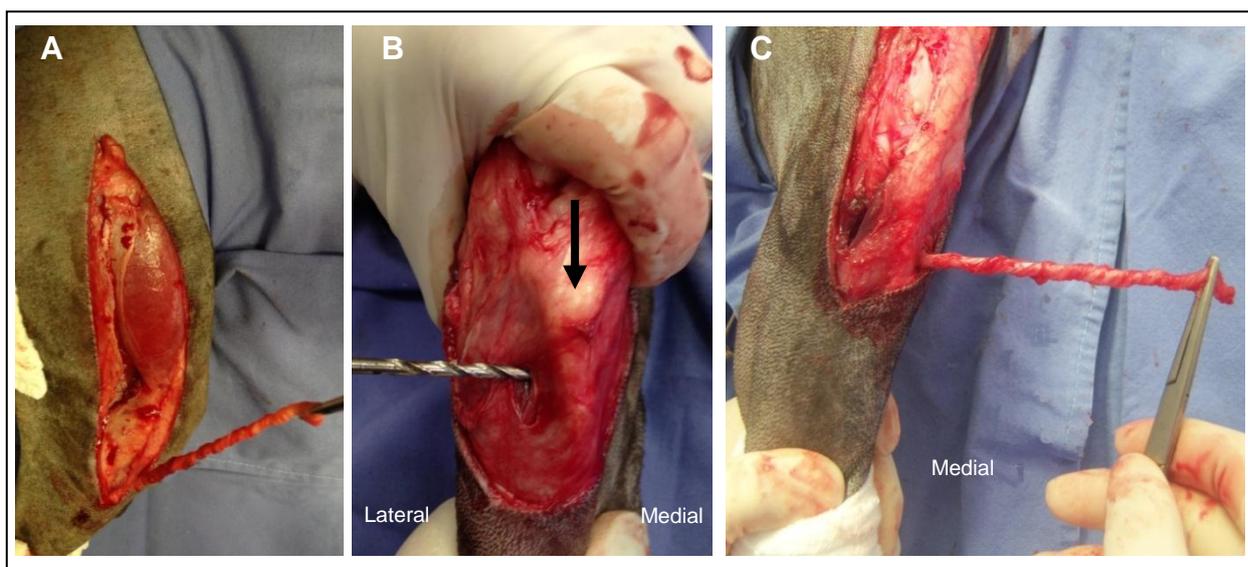


Figura 2: Imagens fotográficas exibindo as condutas cirúrgicas realizadas para a passagem do enxerto de fáscia da porção lateral para a porção medial da articulação. **A)** Enxerto de fáscia lata foi submetido à torção sobre o próprio eixo localizado na porção lateral da tíbia. **B)** Criação de um túnel ósseo entre a tuberosidade da tíbia (seta) e a tíbia, por meio da perfuração transcortical utilizando broca ortopédica, de 4,0mm, acoplada em furadeira autoclavável introduzindo a broca da face lateral para a medial do osso. **C)** Passagem do enxerto da porção lateral para a porção medial da articulação, pelo túnel ósseo.

Realizou-se artrotomia parapatelar lateral permitindo a exposição da tróclea, côndilos femorais e demais estruturas articulares (Figura 3A). Após a inspeção visual das estruturas, foi realizada a ruptura do ligamento cruzado cranial utilizando-se bisturi (cabo 3, lâmina 10) e remoção dos fragmentos do ligamento com auxílio de tesoura de Metzenbaum e pinça de dissecação (Figura 3B). Realizou-se o teste de gaveta cranial para confirmação da RLCCr.

Acima do túnel ósseo que foi criado na tíbia, uma perfuração de 0,8 cm foi confeccionada paralela e medial ao tendão patelar, na sua porção média, para permitir a passagem do enxerto para dentro da articulação. O côndilo femoral e a fabela lateral foram identificados e dissecados para melhor visualização e com o

auxílio de uma agulha em forma de anzol (Figura 3C) o enxerto foi introduzido intra-articular no sentido craniocaudal e mediolateral, saindo caudal à fabela (Figura 3D).

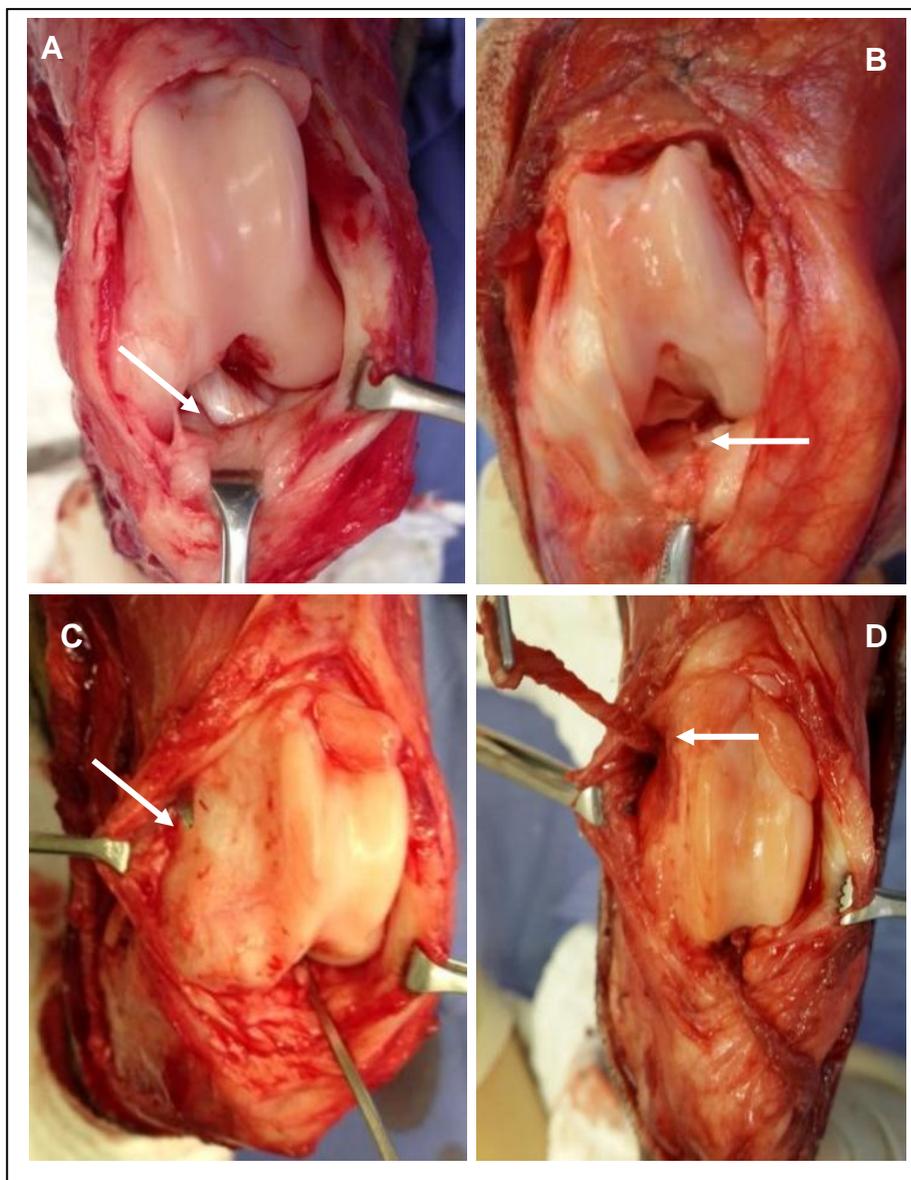


Figura 3: Imagens fotográficas ilustrando a sequência de manobras cirúrgicas visando à substituição do ligamento cruzado cranial. **A)** Artrotomia parapatelar com visualização do ligamento cruzado cranial íntegro (seta). **B)** Imagem fotográfica com visualização do ligamento cruzado cranial rompido (seta). **C)** Seta identificando a agulha em forma de anzol saindo por detrás da fabela. **D)** Visualização do enxerto intra-articular saindo caudal a fabela (seta).

Foi realizada uma perfuração óssea sobre o côndilo femoral lateral, com uma broca 2.8 mm de diâmetro acoplado em furadeira autoclavável, permitindo a

inserção de um parafuso de osso cortical modificado autorroscante de 3.5 mm e uma arruela, ambos de aço inoxidável (Figura 4).

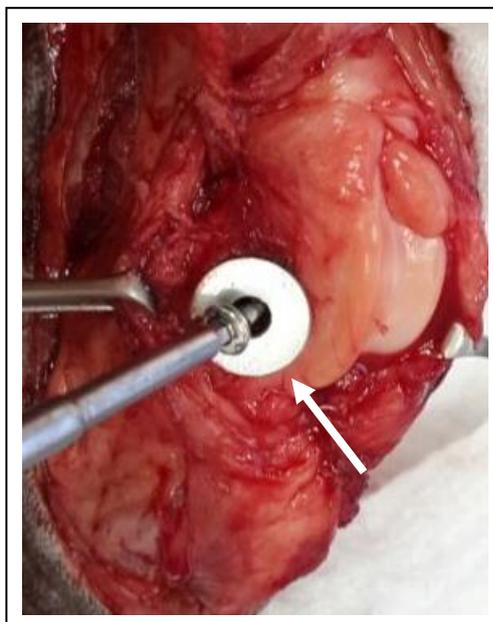


Figura 4: Imagem fotográfica ilustrando a colocação do parafuso e arruela no cõndilo femoral lateral (seta).

As arruelas utilizadas apresentavam diâmetro de 1,2 cm e os parafusos de osso cortical apresentavam as roscas a partir de 3,0 mm abaixo da cabeça e tamanhos variando de 18,0 a 26,0 mm (Figura 5). O tamanho do parafuso utilizado em cada animal foi determinado pela radiografia pré-operatória e deveria abranger a distância entre cõndilo lateral e medial.



Figura 5: Imagem fotográfica ilustrando os parafusos utilizados, ressaltando a rosca 3 mm abaixo da cabeça e as arruelas (seta), ambos de aço inoxidável. (escala = 5 mm).

Para finalizar o membro do paciente foi estendido em posição neutra e o enxerto foi tracionado ao máximo e sob tensão, circulado em torno do parafuso, abaixo da arruela. Ainda com o enxerto sob tensão o parafuso foi rosqueado, fixando assim o enxerto no côndilo femoral. O excesso do enxerto restante foi suturado junto ao periósteo.

Para verificar a correção da ruptura do ligamento cruzado cranial, foi realizado novamente o teste de gaveta cranial, confirmando assim não haver mais o movimento ou apenas uma mínima movimentação.

A cápsula articular foi suturada em padrão de sutura cruzado (Sultan) interrompido, com fio de náilon (2-0). O subcutâneo foi suturado com fio de poliglactina 910 (2-0) com padrão de sutura simples contínuo e a pele suturada com fio de náilon (2-0) e padrão de sutura horizontal em “U” (Wolff) interrompida, concluindo a correção da ruptura do ligamento cruzado cranial com a técnica proposta neste estudo.

2.6 TRATAMENTOS PÓS-OPERATÓRIO - APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS (CTM) X APLICAÇÃO DE SOLUÇÃO TAMPÃO SALINA FOSFATO (PBS)

Quarenta e oito horas após o procedimento cirúrgico de substituição do ligamento cruzado cranial pelo enxerto de fáscia lata, em jejum alimentar de 12 horas, os animais foram pré-medicados com morfina (0,5 mg/kg IM) e acepromazina (0,03 mg/kg IM). Passados quinze minutos, eles foram contidos em decúbito lateral, posicionados sobre uma mesa cirúrgica e novamente realizou-se antissepsia da articulação femorotibiopatelar direita. Por movimentos de extensão e flexão a articulação foi identificada e então foi inserida uma agulha 25x7 dentro da articulação, próxima a inserção do ligamento, e com uma seringa de 1,0 mL, feita a aplicação das CTM na concentração de $1,8 \times 10^6$ cel/0,5 ml PBS nos animais do G2 e/ou de 0,5 ml PBS nos animais do G1.

2.7 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

No pós-cirúrgico os animais foram medicados com anti-inflamatório (meloxicam 0,1 mg/kg, SID) durante 1 dia, analgésico (cloridrato de tramadol 4 mg/kg, BID) durante 5 dias e antibiótico (enrofloxacina 5,0 mg/kg, SID, SC) durante 10 dias.

Para analgesia complementar e reabilitação, os animais foram submetidos a duas sessões diárias de crioterapia (gelo sobre a articulação), por 10 minutos, durante 5 dias. Passados 10 dias de pós-operatório, foram instituídas sessões de fisioterapia, por meio de exercícios de flexão e extensão do membro, alongamento do membro e exercício sobre bola (10 movimentos em 3 ciclos). Também foram realizadas caminhadas leves duas vezes ao dia e exercícios de subir e descer rampa e escadas com duração de 20 minutos (Figura 6).



Figura 6: Imagens fotográficas ilustrando as modalidades fisioterapêuticas realizadas nos cães do grupo 1 e grupo 2, no pós-operatório. **A)** Sessão de crioterapia sobre a articulação e músculo da fáscia lata. **B)** Exercícios sobre a rampa. **C)** Exercícios sobre a bola fisioterapêutica.

Para limpeza da ferida cirúrgica, foi utilizado iodo povidine diluído em solução fisiológica 0,9% até a retirada da sutura 10 dias pós-operatório.

2.8 AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Os pacientes foram acompanhados durante 60 dias pós-operatórios, por meio de avaliação clínica ortopédica (dor, edema, deambulação, teste de gaveta) e radiográfica da articulação do joelho (quanto à presença ou ausência de doença articular degenerativa).

Para fins de registro de dados, aos 5, 10, 15, 30 e 60 dias pós-operatório os parâmetros da avaliação ortopédica eram anotados. Os parâmetros radiográficos foram obtidos aos 15, 30 e 60 dias pós-operatório.

O exame clínico ortopédico baseou-se na quantificação da dor, em graus, de intensidade 0 a 3 (0/Ausente; 1/Leve; 2/Moderado; 3/grave), na quantificação do edema do membro operado em graus, de intensidade 0 a 3 (0/Ausente; 1/Leve; 2/Moderado; 3/Severo), na avaliação da deambulação do paciente e recuperação funcional do membro, em graus, de intensidade 0 a 4 (C-0/ausência de claudicação; C-1/clauidicação leve; C-2/clauidicação moderada; C-3/clauidicação moderada e ocasionalmente não suporta o peso; C-4/clauidicação grave) e no testes de gaveta da articulação, classificada como presente ou ausente.

O teste de gaveta foi realizado com os animais em decúbito lateral esquerdo, com o membro operado para cima e estendido com angulação de aproximadamente 90°, avaliando assim a estabilidade articular pós-operatória.

Para ajudar na avaliação de marcha foram realizado filmagens dos pacientes caminhando, para posterior comparação entre os momentos.

A avaliação radiográfica baseou-se na descrição de alterações compatíveis com doença articular degenerativa, como: presença de osteófitos, entesófitos e esclerose de osso subcondral, localizados em tróclea, côndilos femorais, patela, platô tibial e fíbula, nas projeções lateral e craniocaudal.

2.9 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

A análise estatística das variáveis avaliadas foi realizada pelo sistema Graph Pad Prism[®]. A normalidade da distribuição das variáveis foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov que revelou distribuição não paramétrica. As variáveis dor, edema e claudicação foram testadas pelo teste de Wilcoxon, sendo considerado significativos os valores $p < 0,05$. A avaliação do teste de gaveta e a avaliação radiográfica foram feitas de forma descritiva.

3. RESULTADOS

O protocolo utilizado para isolamento, cultura e expansão das células extraídas do tecido adiposo foi eficiente e permitiu a manutenção das culturas até a quarta passagem, quando as células foram transplantadas e/ou avaliadas. As culturas apresentaram morfologia fibroblastoides, com aderência à garrafa a partir das primeiras avaliações microscópicas de 24 horas e por todos os momentos (Figura 7). A viabilidade celular apresentada pelo teste de Azul de Tripán foi superior a 97%.

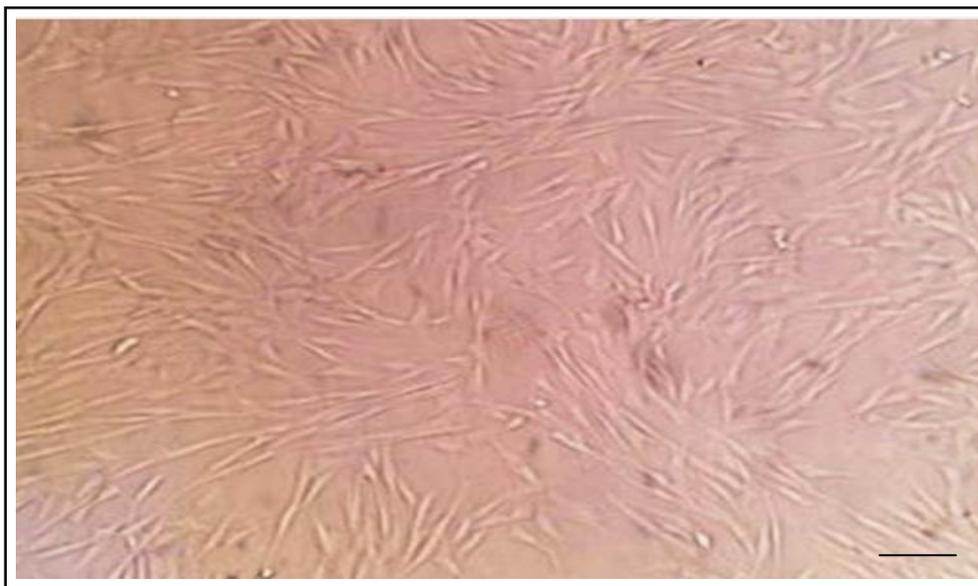


Figura 7: Imagem de microscopia óptica exibindo cultura de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo de cão, demonstrando confluência celular superior a 85%. Presença de células alongadas, de morfometria fibroblastoide e aderidas em substrato plástico da garrafa. Células de quarta passagem. (escala = 100 μ m).

A caracterização fenotípica obtida pela citometria de fluxo mostrou baixa expressão de marcadores de células hematopoiéticas CD45 (6,11%) e CD34 (3,47%) e alta expressão de marcadores de células tronco CD90 (99,0%) e CD29 (95,8%). A cultura em diferenciação osteogênica apresentou nódulos de

mineralização após 21 dias de cultivo em meio osteogênico. A associação desses dados nos permitiu inferir que o grupo de células utilizado no estudo é de células tronco mesenquimais.

O procedimento cirúrgico para substituição do ligamento cruzado cranial ocorreu em um tempo médio de aproximadamente 2 horas sem nenhuma intercorrência que interrompesse a cirurgia, mas deparou com algumas dificuldades no seu decorrer. Uma grande dificuldade encontrada foi na passagem do enxerto intra-articular.

Quanto ao pós-operatório, na avaliação de sensibilidade dolorosa, foi observado que todos os 8 pacientes manifestaram sensibilidade dolorosa moderada com 5 dias de pós-operatório, e 6 dos pacientes com até 10 dias pós-operatório. Esse grau de dor não foi observado nos 2 primeiros dias pós-operatório. Na terceira avaliação apenas 37,5% dos cães ainda demonstravam dor moderada durante a manipulação do membro, sendo que nesta avaliação os cães já estavam sendo submetidos a sessões de exercícios mais intensos. Houve melhora progressiva com o passar dos dias, e aos 60 dias pós-operatório nenhum dos pacientes demonstravam mais sinais de dor (Tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação Ortopédica dos pacientes, considerando o parâmetro DOR, durante o período experimental: Ausente/0 (Ausência de dor); Leve/1 (Vira a cabeça em direção ao membro operado em movimentos de completa extensão e/ou flexão articular); Moderado/2 (Puxa o membro durante extensão e/ou flexão articular, não permitindo movimentação completa); Severo/3 (Relutância em se levantar e/ou vocalização à leve manipulação do membro) (Duarte, 2011).

	Dia 0	5 dias	10 dias	15 dias	30 dias	60 dias
Cão 1	0	2	2	2	1	0
Cão 2	0	2	2	2	1	0
Cão 3	0	2	2	1	0	0
Cão 4	0	2	2	1	0	0
Cão 5	0	2	2	1	0	0
Cão 6	0	2	1	1	0	0
Cão 7	0	2	1	1	0	0
Cão 8	0	2	2	2	0	0

Estatisticamente, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas comparações entre os grupos. Os gráficos da figura 8A mostram apenas uma tendência da dor ter sido menor no grupo 2 (CTM) nos momentos 10 e 15 dias pós-operatório, baseando-se pela mediana, máxima e mínima de cada grupo. No momento 10 dias pós-operatório a mediana encontrada no grupo 1 (PBS) foi de 2,0, enquanto no grupo 2 (CTM) a mediana encontrada foi de 1,5. Semelhante ao encontrado no momento 10 houve uma redução da dor aos 15 dias, conforme figura 8B, na qual é possível observar mediana do grupo 1 igual a 1,5 e no grupo 2 igual a 1,0.

O edema observado nos pacientes foi mais acentuado nos 5 primeiros dias pós-operatório. Apenas o cão 1 apresentou maior grau de edema, que se estendeu até 15 dias pós-operatório (Tabela 2). Estatisticamente, também não foram encontradas diferenças entre os grupos, nos momentos 5 dias ($p = 0,5$), 10 dias ($p > 0,99$) e 15 dias pós-operatório ($p > 0,99$). Nos gráficos pode-se observar que nas comparações dos momentos entre os grupos, o grau máximo do edema foi encontrado apenas do grupo 1.

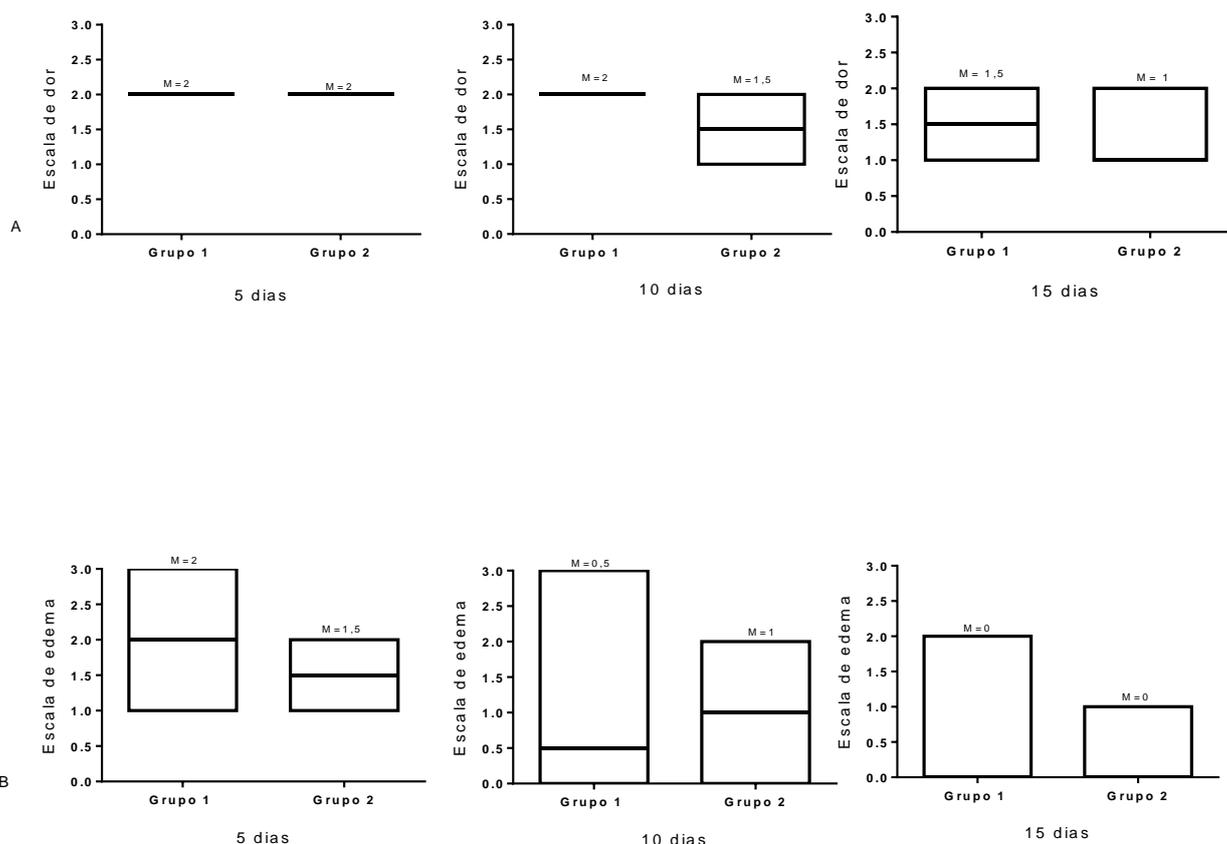


Figura 8: Imagens gráficas ilustrando o grau de dor e edema. **A)** Gráficos ilustrando as comparações entre as medianas, valores máximo e mínimo do grau de dor entre o grupo 1 e grupo 2 durante três momentos de avaliação. **B)** Gráficos ilustrando as comparações entre as medianas, valores máximo e mínimo do grau de edema entre o grupo 1 e grupo 2 durante três momentos de avaliação.

Tabela 2 – Avaliação pós-cirúrgica. Edema: Ausente/0 (Ausência de edema); Leve/1 (Aumento de volume restrito ao local de incisão); Moderado/2 (Aumento de volume em toda a circunferência da articulação femorotibiopatelar); Severo/3 (Aumento de volume em toda a circunferência da articulação femorotibiopatelar estendendo-se para as regiões mais distais do membro). (Duarte, 2011).

	Dia 0	5 dias	10 dias	15 dias	30 dias	60 dias
Cão 1	0	3	3	2	0	0
Cão 2	0	2	1	0	0	0
Cão 3	0	1	0	0	0	0
Cão 4	0	2	0	0	0	0
Cão 5	0	2	2	0	0	0
Cão 6	0	1	1	0	0	0
Cão 7	0	1	0	0	0	0
Cão 8	0	2	1	1	0	0

Na avaliação da claudicação/recuperação funcional do membro, todos os cães, dos dois grupos demonstraram maior grau de claudicação e menor suporte do peso, durante os 10 primeiros dias pós-operatório (Tabela 3). Com o passar dos dias, foi havendo progressão significativa da marcha.

Tabela 3 – Avaliação pós-cirúrgica. Claudicação: C-0 (ausência de claudicação), C-1 (claudicação leve – alterações ocasionais da marcha), C-2 (claudicação moderada – alterações da marcha), C-3 (claudicação moderada – alterações da marcha e ocasionalmente não suporta o peso) e C-4 (claudicação grave - sem suporte do peso).

	Dia 0	5 dias	10 dias	15 dias	30 dias	60 dias
Cão 1	0	C-4	C-4	C-3	C-1	C-1
Cão 2	0	C-4	C-3	C-2	C-2	C-1
Cão 3	0	C-2	C-3	C-3	C-1	C-0
Cão 4	0	C-2	C-3	C-3	C-1	C-0
Cão 5	0	C-3	C-3	C-3	C-0	C-0
Cão 6	0	C-2	C-2	C-2	C-2	C-1
Cão 7	0	C-2	C-2	C-1	C-1	C-0
Cão 8	0	C-3	C-2	C-1	C-1	C-0

Dois cães do grupo 1 (PBS) (cão 1 e 2) e um cão do grupo 2 (CTM) (cão 6) apresentaram claudicação leve com 60 dias de pós-operatório (Tabela 3), sendo que no cão 6, logo após os primeiros 10 dias de pós-operatório foi diagnosticado luxação de patela medial no mesmo membro operado.

Na comparação entre o grupo 1 (PBS) e o grupo 2 (CTM), nenhum momento de avaliação apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no grau de claudicação, no entanto, pode-se dizer que houve uma tendência do grupo 2 (CTM) ter tido recuperação funcional melhor do que o grupo 1 (PBS), conforme a mediana ilustrada nos gráficos da figura 9.

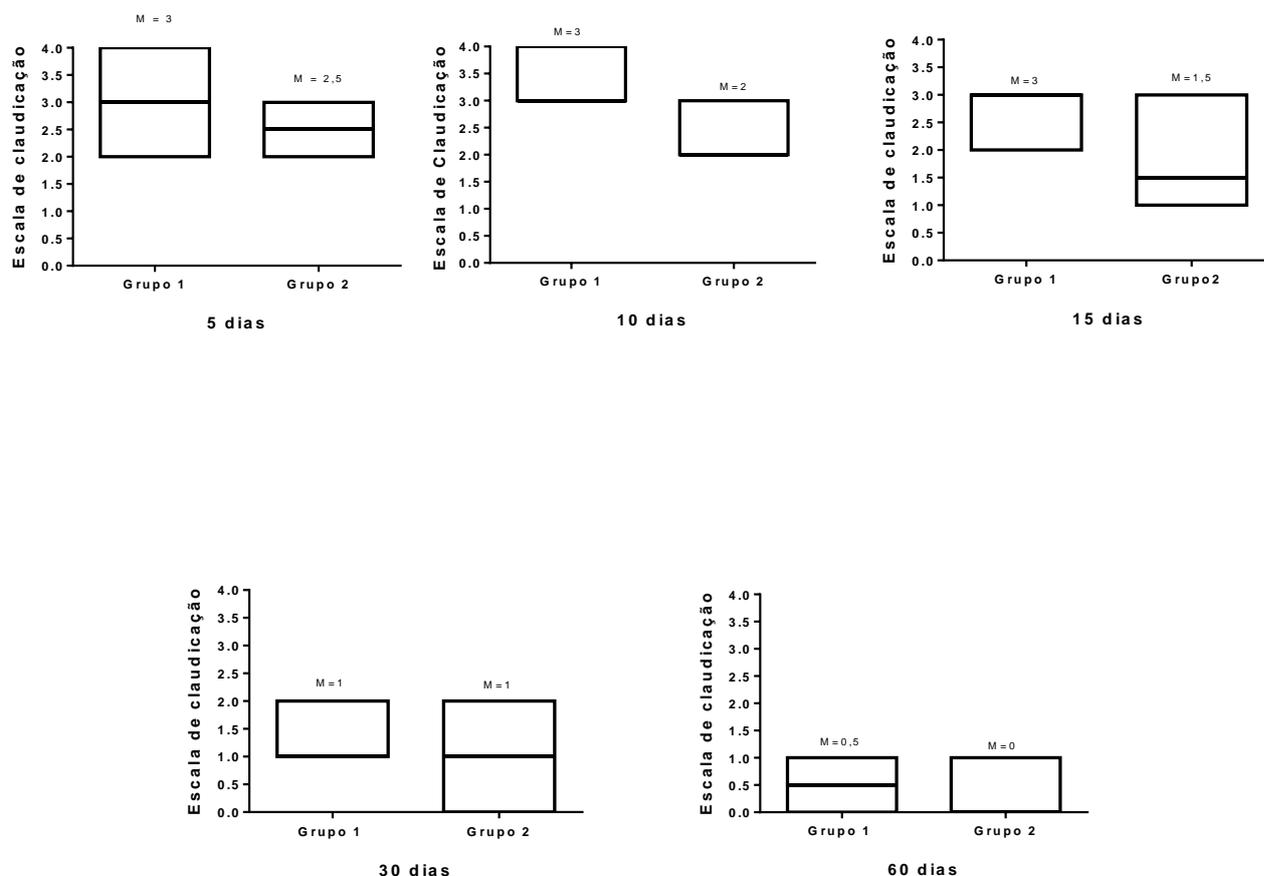


Figura 9: Comparação entre as medianas, valores máximo e mínimo do grau de claudicação entre o grupo 1 e grupo 2 durante cada momento de avaliação. M = valor mediana.

Quanto à avaliação do teste de gaveta, todos os animais, de ambos os grupos apresentaram gaveta presente até a avaliação de 30 dias pós-operatória. Entretanto o movimento era percebido de forma bem discreta.

Os exames radiográficos realizados foram para auxiliar na avaliação da presença ou ausência de osteoartrose nos pacientes operados, assim como também o grau de evolução da doença. Os cães 1, 3, 4 e 6 apresentaram alterações nas radiografias caracterizando a osteoartrose. O cão 1 (G1) apresentou formação de osteófito na superfície patelar, o cão 3 (G1) apresentou osteófito em pólo distal da patela (figura 10), o cão 4 (G1) apresentou formações de osteófitos em pólo proximal

e caudal da patela e platô tibial visualizados na projeções craniocaudal e mediolateral (Figura 11). No cão 6 (G2), a alteração encontrada foi uma leve proliferação óssea em platô tibial.

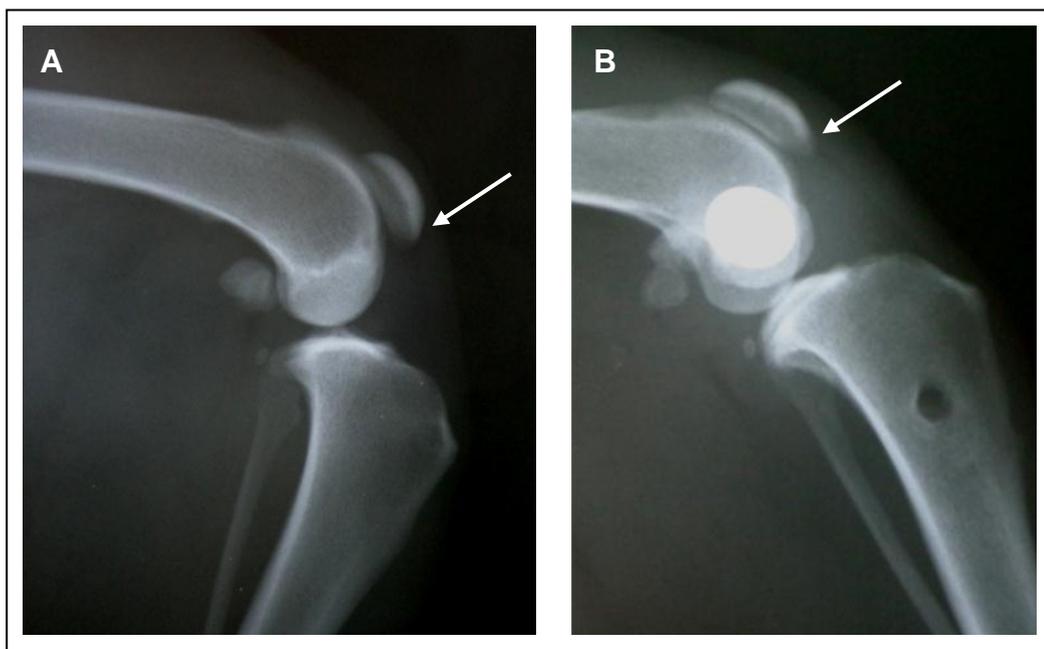


Figura 60: Imagens fotográficas de radiografias ilustrando articulação femorotibiopatelar do cão 3 (G1). **A)** Radiografia mediolateral pré-operatória, ilustrando não haver sinais de osteoartrose em pólo distal da patela (seta). **B)** Radiografia mediolateral aos 30 dias de pós-operatório com osteófito em pólo distal da patela (seta).

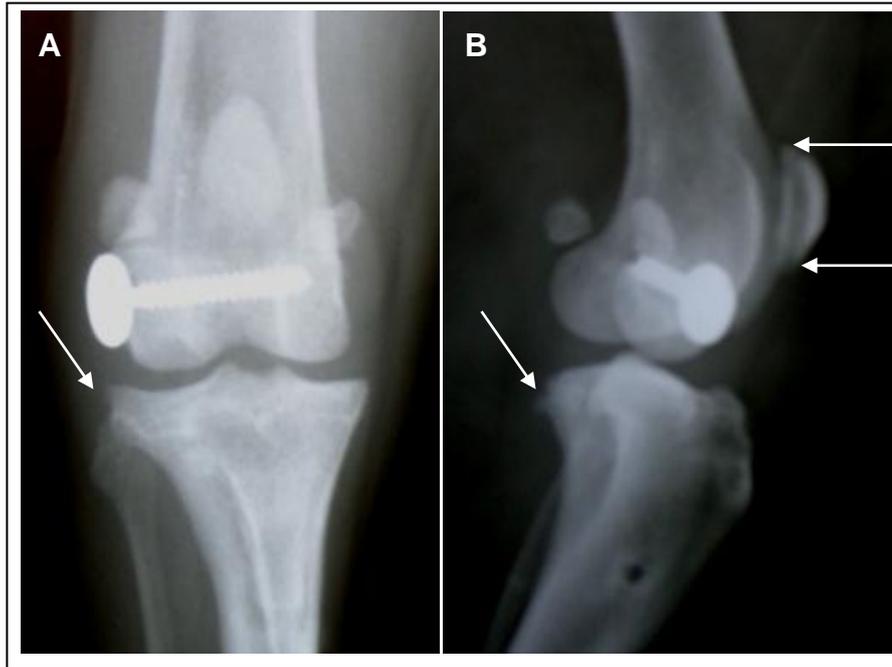


Figura 71: Imagens fotográficas de radiografias ilustrando alterações de osteoartrose no cão 4 (G1). **A)** Radiografia craniocaudal com proliferação osteófitas em platô tibial (ponta da seta). **B)** Radiografia mediolateral com proliferação osteófitas em platô tibial e pólo proximal e distal da patela (setas).

As alterações foram visualizadas no cão 1 (G1), já a partir do primeiro exame (15 dias pós-operatório), no cão 3 (G1) com 30 dias pós-operatório e no cão 4 (G1) e 6 (G2) com 60 dias pós-operatório.

Comparando os dois grupos, foi observado que no grupo 2 (CTM) apenas um paciente apresentou alterações radiográficas compatíveis com osteoartrose, enquanto no grupo 1 (PBS), três pacientes apresentaram tais alterações.

4. DISCUSSÃO

Muitas são as técnicas descritas para a correção do ligamento cruzado cranial. A técnica escolhida foi adaptada do estudo de Duarte et al. (2013) que utilizou a fásia lata para reconstrução do ligamento cruzado cranial fixando-a no côndilo femoral e no tendão patelar. No presente estudo, o enxerto foi fixado apenas no côndilo femoral e demonstrou um resultado mais satisfatório, pois não houve limitação de movimento articular como encontrado no estudo de Duarte (2011).

Um grande obstáculo quanto à técnica utilizada, foi na passagem do enxerto com a ajuda de uma agulha na forma de anzol, por dentro da articulação, que gerou grande dificuldade, correndo o risco de o enxerto romper como ocorrido no estudo piloto. Essa limitação não foi descrita por Duarte (2011). Outro fator limitante é o momento de fixação do enxerto no côndilo femoral, pois no momento do aperto do parafuso sobre a arruela, foi necessária a tração forte do enxerto com o membro do paciente estendido, para não haver frouxidão do mesmo e conseqüentemente movimento de gaveta. Em seu estudo em humanos, Grover et al. (2005) observaram que a tração aplicada ao enxerto não foi transmitida a porção intra-articular do mesmo, o que permitiu movimentação cranial da tíbia. Isso explica o fato de todos os pacientes terem apresentado movimento de gaveta durante 30 dias pós-operatório. No estudo de Markolf et al. (2003), também não foi possível o tensionamento adequado para anular movimentos.

Entretanto, Moore e Read (1996) afirmaram que nenhuma técnica de correção da RLCCr com substituição do ligamento é capaz de promover uma estabilidade articular absoluta. Shires et al. (2008) também garantem que nenhuma

técnica provou ser superior a outra. Logo a presença do movimento de gaveta encontrado no presente estudo não demonstrou ser erro de técnica.

Outras técnicas para correção da ruptura do ligamento cruzado cranial, como as técnicas de osteotomia, visam mais a biomecânica da articulação e não a reconstrução do ligamento cruzado, contudo necessitam de instrumentais específicos como serras oscilatórias, placas ortopédicas específicas e cage (expansores ósseos). Modenato et al. (2005) e Boudrieau (2009) afirmaram que mesmo dependendo destes instrumentais e mediante ao treinamento da equipe, as osteotomias são técnicas relativamente simples e eficazes ao comparar com a técnica estudada. Vale lembrar também que, durante a realização do nosso estudo, utilizamos um parafuso específico, idealizado com a rosca inicial alguns milímetros abaixo da cabeça para a fixação do enxerto não causar ruptura do mesmo no momento do aperto do parafuso.

Duarte (2011) observou em seu estudo, que 40% dos animais apresentaram luxação de patela lateral após a cirurgia, devido ao volume de material gerado pela fixação do parafuso e arruela no côndilo lateral do fêmur e sob a cápsula articular. No presente estudo esse volume não foi observado e também foi proposto a fixação do enxerto apenas no côndilo femoral para justamente evitar a fixação sobre o tendão patelar que poderia levar a luxação de patela. Mesmo assim, houve um caso de luxação de patela (cão 6) que pode ter sido decorrente do volume gerado dentro da cápsula articular como citado por Duarte (2011), ou por uma possível frouxidão da sutura capsular. Essa luxação de patela explica o fato do cão 6 ter manifestado claudicação com até 60 dias pós-operatório.

As variáveis de dor, edema e claudicação, que foram avaliadas estatisticamente não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Tais resultados devem-se ao fato de todo o procedimento cirúrgico e pós-operatório terem sido iguais em todos os pacientes, com tendência a se amenizar ao longo dos 60 dias.

Na avaliação de sensibilidade dolorosa, foi observado que na primeira avaliação todos os pacientes demonstraram dor moderada à manipulação do membro. Optou-se pela não utilização de medicação anti-inflamatória, no pós-operatório, para que esta não interferisse com a ação das células tronco mesenquimais (Nauta e Fibbe, 2007; Monteiro et al., 2009), aplicadas 48 horas após o procedimento. Clinicamente foi observado um grau de dor menor nos pacientes do grupo 2 (CTM), corroborando como o estudo de Huurne et al. (2012) que afirmaram existir potencial efeito anti-inflamatório após injeção de células tronco intra articular nos joelhos de ratos.

O edema apresentado pelos pacientes é uma reação normal do organismo após um trauma ou procedimento cirúrgico. Em dois dos casos o edema pós-operatório estendeu-se por até 15 dias, principalmente no cão 1 do grupo 1 (PBS) que apresentou maior grau de edema, pelo fato de ter ocorrido muita divulsão de tecidos moles no trans-operatório. No estudo de Duarte (2011), não foi observado nenhum caso de edema grave, e a mesma afirma ter sido devido a compressas de gelo, também realizadas no presente estudo e utilização de bandagem.

Assim como no estudo de Duarte (2011), todos os cães apresentaram maior grau de claudicação nos primeiros 15 dias pós-operatório, evoluindo para uma melhora progressiva até os 60 dias. Baraúna Junior et al. (2007), que utilizaram uma técnica

extracapsular, observaram claudicação leve até 180 dias pós-operatório em todos os cães operados.

Os exercícios de fisioterapia, utilizados no presente estudo, seguiu a recomendação de Marsolais et al. (2002) e Muzzi et al. (2009), que observaram efeitos benéficos de diferentes modalidades fisioterapêuticas empregadas no pós-operatório de cirurgia de joelhos nos cães, por acarretar reabilitação, retorno funcional precoce, estabilidade articular e prevenção da atrofia muscular. Duarte (2011) relatou em seu estudo que a fisioterapia no pós-cirúrgico, auxiliou na recuperação mais rápida no apoio do membro, na estabilidade articular e na prevenção da atrofia muscular.

Devido à instabilidade outrora observada Shire et al. (2008) e Moore e Read (1996), afirmaram que nenhuma técnica cirúrgica para correção da ruptura do ligamento cruzado é capaz de deter a progressão da osteoartrose. No presente estudo, observou-se o aparecimento de sinais leves de osteoartrose em 50% dos pacientes estudados, corroborando com os autores supracitados.

Duarte et al. (2013) relataram terem encontrado também, alterações radiográficas compatíveis com osteoartrose em 40% dos animais estudados e Baraúna Junior et al. (2007), que utilizaram outra técnica cirúrgica relataram terem observado evolução nas alterações degenerativa em 84,6% dos joelhos operados.

A aplicação das células tronco mesenquimais foi realizada 48 horas após a cirurgia, seguindo a explicação de Huurne et al. (2012), que disseram haver mais efeito celular nos primeiros dias após a indução da osteoartrose, sendo potencializado com a interação dos mediadores pró-inflamatórios.

A indicação da terapia com células tronco mesenquimais objetivou a inibição da progressão da osteoartrose, conforme apresentado por Coleman et al. (2010), Cristante e Narazaki (2011) e Huurne et al. (2012). Avaliando os grupos estudados, foi observado que no grupo 2 (CTM), o número de cães que apresentou alteração radiográfica compatível com osteoartrose foi menor.

Huurse et al. (2012) encontraram indicações que o uso de uma única aplicação de células tronco derivadas de tecido adiposo na articulação é capaz de auxiliar na osteoartrose, inibindo o espessamento da cápsula sinovial, a formação de entesófitos e a destruição cartilaginosa, o que reforça as observações do presente estudo.

5. CONCLUSÃO

A técnica proposta para substituição do ligamento cruzado cranial utilizando fásia lata e sua fixação no côndilo femoral lateral é eficiente para estabilizar a articulação femorotibiopatelar de cães com ruptura de ligamento cruzado cranial, proporcionando a recuperação funcional do membro, porém é incapaz de impedir a progressão da doença articular degenerativa.

O uso de células tronco mesenquimais, mostrou resultado satisfatório na ocorrência de osteoartrose, mas ainda é necessário um estudo mais prolongado e com um número maior de animais.

A complexidade da técnica pode ser um fator limitante para a escolha da mesma e vai depender da habilidade e preferência do cirurgião.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baraúna Junior D, Roehsig C, Rocha LB, Chioratto R, Tudury EA. Técnica de interligação extra capsular fêmoro-fabelo-tibial na ruptura do ligamento cruzado cranial em cães: achados clínicos e radiográficos. *Ciência Rural* 2007, 37(3): 769-776.

Borges NF, Rezende CMF, Melo EG, Malm C, Gheller VA, Silva CRN, Doretto JV. Vídeo-artroscopia da articulação fêmoro-tíbio-patelar em cães após secção do ligamento cruzado cranial guiada por artroscopia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2008, 60(5): 1035-1044.

Boudrieau RJ. Tibial Plateau Leveling Osteotomy or Tibial Tuberosity Advancement. *Veterinary Surgery* 2009, 38:1–22.

Coleman CM, Curtin C, Barry FP, O' Flatharta C, Murphy JM. Mesenchymal Stem Cells and Osteoarthritis: Remedy or Accomplice? *HUMAN GENE THERAPY* 2010, 21:1239–1250.

Cristante AF, Narazaki DK. Avanços no Uso de Células-Tronco em Ortopedia. *Revista Brasileira de Ortopedia* 2011, 46(4): 359-67.

Duarte TS. Estabilização da Articulação Femorotibiopatelar com a Fixação Dupla da Fáscia Lata Após Ruptura Experimental do Ligamento Cruzado Cranial em Cães, 2011. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

Duarte TS; Del Carlo RJ; Pontes KCS; Andrade EC; Fernandes N; Perdigão AP. Estabilização da Articulação Femorotibiopatelar com a Fixação Dupla da Fáscia Lata

Após Ruptura Experimental do Ligamento Cruzado Cranial em Cães. ARS VETERINARIA 2013, 29(2): 068-076.

Dymond NL, Goldsmid SE, Simpson DJ. Tibial tuberosity advancement in 92 canine stifles: initial results, clinical outcome and owner evaluation. Australian Veterinary Journal 2010, 88(10):381-385.

Grover DM, Howell SM, Hull ML. Early Tension Loss in na Anterior Cruciate Ligament Graft. The Journal of Bone e Joint Surgery 2005, 87A (2): 381-390.

Harasen G. Diagnosing rupture of the cranial cruciate ligament. Canadian Veterinary Journal 2002, 43:475-476.

Huurne MT, Schelbergen R, Blattes R, Bolm A, Munter W, Grevers LC, Jeanson J, Noel D, Casteilla L, Jorgenses C, Van Den Berg W, Lent PLEM. Antiinflammatory and Chondroprotective Effects of Intraarticular Injection of Adipose-Derived Stem Cells in Experimental Osteoarthritis. Arthritis & Rheumatism 2012, 64(11): 3604-3613.

Johnson AL, Hulse DA. Artropatias. In: Fossum TW. Cirurgia de pequenos animais. 2 ed. São Paulo: Rocca; 2005. p. 1103-1108.

Kipfer NM, Tepic S, Damur DM, Guerrero T, Hässig M, Montavon PM. Effect of tibial tuberosity advancement on femorotibial shear in cranial cruciate-deficient stifles. An *in vitro* study. Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology 2008, 21:1-6.

Lemos MA. Indução Da Diferenciação de Células Derivadas de Tecido Adiposo em Células da Linhagem Osteogênica, 2008. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Markolf KL, O'Neill G, Jackson SR, McAllister DR. Reconstruction of Knees with Combined Cruciate Deficiencies: A Biomechanical Study. *The Journal of Bone e Joint Surgery* 2003, 85(9): 1768-1774.

Marsolais GS, Dvorak G, Conzemius MG. Effects of postoperative rehabilitation on limb function after cranial cruciate ligament repair in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002, 1, 220(9): 1325-1330.

Modenato M, Borghetti L, Ballatori C, Romeo T. Tibial tuberosity advancement (TTA) as a possible solution to the cranial cruciate ligament rupture in the dog. *Annali Della Facoltà di Medicina Veterinaria Di Pisa* 2005, LVIII: 253-262.

Monteiro BS; Argolo Neto NM; Del Carlo RJ. Células-Tronco Mesenquimias. *Ciência Rural Online* 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a409cr1878.pdf>.

More KW, Read RA. Rupture of the Cranial Cruciate Ligament in Dogs Part II. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1996, 18(4): 381-391.

Muzzi LAL, Rezende CMF, Muzzi RAL. Fisioterapia após substituição artroscópica do ligamento cruzado cranial em cães. I - avaliação clínica, radiográfica e ultrassonográfica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2009, 61(4): 805-814.

Nauta AJ, Fibbe WE. Immuno modulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007, 110(10): 3499-3506.

Nogueira RC. Isolamento, Caracterização e Análise da Estabilidade Citogenética Após Expansão *In Vitro* de Células Tronco Mesenquimais Derivadas do Epitélio Amniótico, Tecido Adiposo e Polpa de Dente Decíduo Humano, 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana

Oliveira RR, Mamprim MJ, Rahal SC, Bicudo ALC. Radiografia e ultrassonografia no diagnóstico da ruptura do ligamento cruzado cranial em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2009, 29(8): 661-665.

Parreira RC, Resende RR. Células-Tronco Mesenquimais, o que são e de Onde Vêm? O NANOCELL NEWS 2013, 1(2). Disponível em <http://sbosc.org.br/nanocell/celulas-tronco-mesenquimais-o-que-sao-e-de-onde-vem/>.

Pinto Filho STL, Treichel TLE, Aramburú Junior JS, Rosa MB, Dalmolin F, Brun MV, Krause A, Pippi NL. Células-Tronco Mesenquimais Adultas: Características e Aplicações Experimentais em Animais. *Veterinária e Zootecnia* 2013, 20: 49-59.

Queiroz RA, Almeida EL, Silva MMS, Lima ER, Nascimento HB, Ribeiro JJS. Efeito das Células-Tronco Autógenas nas Doenças Articulares Degenerativas Displásicas. Estudo em Cães. – Em Desenvolvimento. Disponível em <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1061-1.pdf>. Acesso em 01 de fevereiro 2014.

Schulz, K. Afecções articulares. In: Fossum TW. *Cirurgia de pequenos animais*. 3 ed. São Paulo: Rocca; 2008. p. 1272-1275.

Shires PK, Tilley LP, Smith Jr FWK. Consulta Veterinária em 5 Minutos – Manual de Especialidades Caninas e Felinas – Distúrbios Musculoesqueléticos. São Paulo: Manole; 2008. p.93-100.

Vasseur PB. Articulação do Joelho. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 2 ed. São Paulo: Manole; 1998. v 2, p. 2156-2165.

Vézina-Audette R, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP, Laverty S. Inflammatory stimuli differentially modulate the transcription of paracrine signaling molecules of equine bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013, 21: 1116 – 1124.