



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS, DERIVADAS
DE TECIDO ADIPOSEO, NA REPARAÇÃO DA OSTEOTOMIA
APÓS AVANÇO DA TUBEROSIDADE TIBIAL EM CÃES**

CLARISSA ROCHA DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

**BRASÍLIA/DF
JUNHO/2017**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS, DERIVADAS
DE TECIDO ADIPOSEO, NA REPARAÇÃO DA OSTEOTOMIA
APÓS AVANÇO DA TUBEROSIDADE TIBIAL EM CÃES**

Clarissa Rocha dos Santos

ORIENTADOR: Eduardo Maurício Mendes de Lima

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 143/2017

**BRASÍLIA/DF
JUNHO/2017**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS, DERIVADAS
DE TECIDO ADIPOSEO, NA REPARAÇÃO DA OSTEOTOMIA
APÓS AVANÇO DA TUBEROSIDADE TIBIAL EM CÃES**

CLARISSA ROCHA DOS SANTOS

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL**

APROVADA POR:



EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA, doutor (UnB)



JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES, doutor (UnB)



RICHARD DA ROCHA FILGUEIRAS, doutor (Pet Especialidades)

BRASÍLIA, 09 de JUNHO de 2017

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SANTOS, C. R. Uso de células tronco mesenquimais, derivadas de tecido adiposo, na reparação da osteotomia após avanço da tuberosidade tibial em cães. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 63p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Clarissa Rocha dos Santos

Uso de células tronco mesenquimais, derivadas de tecido adiposo, na reparação da osteotomia após avanço da tuberosidade tibial em cães. Clarissa Rocha dos Santos, orientação de Eduardo Maurício Mendes de Lima

- Brasília, 2017. 63p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

1. Avanço da tuberosidade tibial. 2. Células-tronco. 3. Ligamento cruzado. 4. joelho. I. Lima, E.M.M. II. Uso de células tronco mesenquimais, derivadas de tecido adiposo, na reparação da osteotomia após avanço da tuberosidade tibial em cães.

DEDICATÓRIA

Aos meus dois amores, Felipe Romão e Maria Luiza, motivos de alegria e meus incentivos diários em melhorar sempre. À minha família, fonte de amor e carinho para continuar sempre. A todos os meus pacientes, alicerces da minha busca constante pelo conhecimento e profissionalismo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo privilégio de desfrutar do melhor dos experimentos, minha vida.

Aos meus pais, Lucia Maria e Romoaldo Wellington, que além me trazerem a este mundo, foram também responsáveis por tudo que sou hoje. Aos pais que a vida me deu, Ana Amélia e Francisco de Assis, a chegada de vocês tornou-se uma benção em nossas vidas.

Ao meu namorado e companheiro, Felipe Romão, por estar sempre ao meu lado, independente das condições que a vida nos impõe. Eu amo você!

Ao meu pequeno pedaço, fonte inesgotável de amor e carinho, Maria Luiza. Mais do que filha, minha inspiração e motivo para sempre ser melhor.

Aos meus irmãos, Maria Clara, Lucas, Kamila e Paula. Por me terem como modelo e por serem meu orgulho.

Aos meus sogros e cunhada, Sílvia, Eliton e Gabi. Obrigada por não desistirem de mim e acreditarem no meu potencial em todos os sentidos.

À minha família e amigos, vocês são presentes de Deus, e estão sempre em meus pensamentos e orações.

Ao meu orientador/professor, Eduardo Maurício, primeiramente por ter aceitado a orientação desse trabalho e paciente e compreensivelmente ter me dado oportunidades de corrigi-lo. Obrigada pela orientação pessoal e bons conselhos.

Ao professor e mestre, Richard Filgueiras, pela confiança depositada em mim para a realização do experimento, além de todo conhecimento compartilhado ao longo desses anos. Exemplo de profissional e inspiração para a carreira de ortopedista.

À Biocell, através da Patrícia Malard, que aprovou, incentivou e contribuiu diretamente com a realização desse experimento.

Ao Hospital Veterinário Dr. Antônio Clemenceau, que na figura do Dr. Richard, cedeu suas instalações para a realização de toda a parte prática do experimento.

Aos colegas, Kaique e Carol e as amigas Priscilla Gonçalves e Luana Paes, pela ajuda e contribuição com a avaliação das imagens.

A todos os proprietários que gentilmente confiaram e autorizaram a participação dos seus animais nesse projeto.

“Temos de fazer o melhor que podemos. Esta é a nossa sagrada responsabilidade humana.”

Albert Einstein

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL	3
2. TÉCNICAS CIRÚRGICAS DE CORREÇÃO	6
2.1. Técnicas intracapsulares	7
2.2. Técnicas extracapsulares	8
2.2.1. Sutura fabelo-tibial.....	8
2.2.2. Osteotomia de nivelamento do platô tibial (TPLO)	8
2.2.3. Avanço da tuberosidade tibial (TTA).....	9
3. AVANÇO DA TUBEROSIDADE TIBIAL (TTA).....	10
3.1. Escolha da técnica	11
3.1.1. Ponto de inserção do tendão patelar alto e baixo	11
3.1.2. APT aumentado	12
3.1.3. Deformidades angulares e torções dos membros	12
3.1.4. Tamanho do paciente	13
3.2. Planejamento cirúrgico	13
3.2.1. Posicionamento radiográfico pré-operatório	13
3.2.2. Definição do platô tibial	14
3.2.3. Escolha do <i>cage</i>	15
3.2.4. Escolha da placa	17
3.2.5. Procedimento cirúrgico	18
3.2.6. Pós-operatório	19

4. USO DAS CÉLULAS-TRONCO	19
4.1. Células-tronco mesenquimais (CTMs).....	19
4.2. Colheita, isolamento e caracterização	19
4.3. Células-tronco na reparação óssea	20
4.4. Uso das células-tronco de origem do tecido adiposo	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
1. AVALIAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS	23
2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS – PRÉ-OPERATÓRIO/PÓS-OPERATÓRIO	23
2.1. Procedimento de analgesia e anestesia	23
2.2. Procedimento cirúrgico	23
2.3. Cuidados pós-operatórios	26
2.4. Análise radiográfica	26
2.5. Diferenciação osteogênica	27
2.6. Densidade das trabéculas ósseas dispostas na substância esponjosa	28
2.7. Análise estatística	30
RESULTADOS	31
1. AVALIAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS	31
2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS – PRÉ-OPERATÓRIO E PÓS-OPERATÓRIO	31
2.1. Procedimento cirúrgico	31
2.2. Complicações pós-operatórias	32
2.3. Análise radiográfica	33
3. DENSIDADE DAS TRABÉCULAS ÓSSEAS DISPOSTAS NA SUBSTÂNCIA ESPONJOSA	35
DISCUSSÃO	36
CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS.....	43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - (A) Fotografia e (B) desenho de um joelho flexionado de um cão. Vista cranial após remoção da gordura infrapatelar. 1a: banda caudolateral do LCC; 1b: banda craniomedial do LCC; 2: ligamento cruzado caudal; 3: menisco medial; 4: menisco lateral; 5: tendão do músculo extensor digital longo; 6: côndilo femoral medial (Muir et al. 2010).....4
- Figura 2 - (A) Posicionamento para realizar teste de gaveta. Deve-se colocar o dedo indicador na crista tibia e o dedo polegar na cabeça da fibula, e a com a outra mão o dedo indicador apoiado na patela e o dedo polegar na fabela lateral. (B) Posicionamento para realizar teste de compressão tibial. Deve-se colocar um dedo indicador na crista tibial para determinar se o deslocamento cranial da tibia ocorre quando o jarrete é flexionado com a outra mão (Muir et al. 2010).....6
- Figura 3 - Representação esquemática das forças tibiofemorais da articulação de um joelho antes (A) e após (B) a osteotomia de nivelamento do platô tibial (TPLO). Para aplicação dessa técnica considera-se que a força de reação articular (seta rosa) na articulação do joelho é aproximadamente paralela ao eixo longitudinal da tibia. (A): Em um joelho com RLCC a força de reação articular pode ser dividida em um componente de cisalhamento tibiofemoral dirigido cranialmente, paralelo ao platô tibial (seta amarela) e uma força de compressão articular, perpendicular ao platô tibial (seta amarela). (B): Após nivelar o platô tibial, o vetor de força de cisalhamento tibiofemoral torna-se zero, e a força de compressão articular e a força resultante tornam-se uma só (Setas rosa e amarela) (Muir et al. 2010).....9
- Figura 4 - Representação esquemática das forças tibiofemorais da articulação de um joelho antes (A) e após (B) o avanço da tuberosidade tibial (TTA). Para aplicação dessa técnica considera-se que a força de reação articular (seta rosa) é aproximadamente paralela ao tendão patelar. (A): No joelho com RLCC a força de reação articular pode ser dividida em um componente de cisalhamento tibiofemoral dirigido cranialmente (seta amarela) e uma força de compressão articular perpendicular ao platô tibial (seta amarela). (B): Ao avançar a tuberosidade tibial cranialmente, o tendão da patela torna-se perpendicular ao platô tibial. A força de reação articular (seta rosa), portanto, torna-se perpendicular ao platô tibial durante o suporte de peso

e, portanto, se iguala a força de compressão articular (seta amarela) e o deslocamento tibial cranial é eliminado (Muir et al. 2010).....	10
Figura 5 - Radiografias laterais da articulação do joelho demonstrando a variação entre os pontos de inserção do tendão patelar na tuberosidade tibial. (A) tuberosidade tibial com ponto de inserção baixo, e (B) tuberosidade tibial com ponto de inserção alto. A posição do <i>cage</i> é demonstrada pelas setas com duas pontas (Muir et al. 2010).....	11
Figura 6 - Radiografias médio-laterais do joelho de um cão demonstrando diferenças no APT. Em (A) é considerado excessivo com 43° e em (B) dentro do limite normal com 25°. Se comparada com (B), a inclinação do APT em (A) coloca a articulação numa posição relativamente de hiperextensão e a TTA não corrige essa alteração, pois o APT permanece inalterado (Boudrieau 2009).	12
Figura 7 - Ângulo de flexão do joelho (AFJ): Imagem radiográfica médiolateral do joelho de um cão demonstrando que o AFJ é medido na intersecção de uma linha que se origina do ponto médio do fêmur ao nível do trocânter menor e se estende até a eminência intercondilar e uma linha que se origina no ponto médio mais distal na tíbia até a eminência intercondilar (Cadmus et al. 2014).....	14
Figura 8 - O platô tibial é definido por uma linha que une pontos em suas margens articulares cranial e caudal (círculos laranjas). O ângulo do tendão patelar de 90° é estabelecido estendendo-se uma linha que é perpendicular ao platô tibial até o ponto de origem do tendão patelar ao longo da borda cranial da patela (Cadmus et al. 2014).	15
Figura 9 - Imagem radiográfica mediolateral do joelho de um cão demonstrando o uso da sobreposição transparente para planejar o tamanho do <i>cage</i> . A sobreposição transparente foi usada de acordo com as instruções do fabricante (Cadmus et al. 2014)	16
Figura 10 - Imagem radiográfica mediolateral do joelho de um cão demonstrando como determinar o avanço necessário e, assim, o tamanho do <i>cage</i> , dentre os tamanhos 6, 9 e 12 mm, para o TTA. Observe que os pontos de referência utilizados são os pontos de inserção	

dos ligamentos cruzados cranial e caudal (setas laranjas), a margem cranial da patela (seta azul) e a tuberosidade tibial (seta preta) (Hoffmann et al. 2006)..... 17

Figura 11 - (A) Na maioria dos cães a placa pode ser alinhada paralelamente à borda cranial da crista da tíbia (setas superiores), o que resulta em uma localização ligeiramente cranial da extremidade distal da placa (setas inferiores); (B) Em alguns cães a crista tibial não é tão proeminente distalmente e, portanto, o alinhamento do molde (e placa) paralelo à crista da tíbia (pontas das setas superiores) resultará em um alinhamento mais caudal da porção distal da placa em relação ao eixo central da tíbia antes do avanço (setas inferiores); (C) Alinhar o molde (e a placa) de modo que o aspecto proximal esteja posicionado mais caudalmente (seta curta superior) resultará em um alinhando ligeiramente cranial da porção distal da placa ao longo do eixo tibial (setas inferiores), esta é a posição desejada; (D) Radiografia pós-operatória mostrando a posição da placa (comparar com C; seta curta superior), após a TTA, a porção distal da placa se move caudalmente (setas inferiores) e agora repousa mais uma vez ao longo do eixo tibial (Lafaver et al. 2007)..... 18

Figura 12 – Fotografia crânio-medial demonstrando aplicação percutânea de células-tronco no sítio de osteotomia utilizando seringa de 1 ml e agulha hipodérmica 30X8, 8 dias após o procedimento cirúrgicos 25

Figura 13 - Modelo esquemático demonstrando (A) Posição da osteotomia e (B) Ilustração pós-operatória da TTA indicando os locais de avaliação do preenchimento ósseo. Os sítios foram definidos como (1) a região de osteotomia proximal ao *cage*, (2) região de osteotomia entre o *cage* e a placa, e (3) a região de osteotomia distal à placa (Kim et al. 2010)..... 27

Figura 14 - Microscopia óptica (aumento 400X) demonstrando (A) as CTMs, (B) as células-tronco diferenciadas em osteócitos com presença da matriz extra-celular preenchida por cálcio (Setas pretas) e (C) osteócitos após coloração Von Kossa demonstrando preenchimento por cálcio..... 28

Figura 15 – Ilustração do uso do programa de análise de imagens Image-Pro Plus 6.0® para quantificação da densidade de osso trabecular. Para a avaliação, após a imagem estar aberta no programa (A), deve ser aberta a guia "perform segmentation" (seta vermelha). Com a nova guia aberta, com o auxílio do conta gotas (seta vermelha) (B), selecionar a área

correspondente ao tecido ósseo (seta preta) para marcação e destaque da área em questão (C). Após a marcação, foi aplicado o efeito de máscara para contraste entre branco (área a ser avaliada) e preto (seta vermelha) (D). Em seguida, com auxílio da ferramenta de histograma do programa, arrastar a linha da direta do histograma (E) para o final do mesmo (setas vermelhas) (F), para que apenas a área branca previamente marcada seja quantificada, apresentando o resultado em porcentagem (elipse vermelha) 29

Figura 16 - Fotografia demonstrando a caixa do sistema de TTA com bloqueio da marca Focus® utilizado para a realização do experimento. A esquerda (seta preta) os diferentes tamanhos de placas que variam de 0,5 a 6 e na região central (seta branca) os tamanhos de *cages* disponíveis (06, 09 e 12)..... 32

Figura 17 - Radiografias demonstrando os períodos avaliados e os escores dados de forma subjetiva. Imagens A, B, C, D e E representam animal do GT, respectivamente nos períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Imagens F, G, H, I e J representam animal do GC, respectivamente nos períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias. *Score* II (A), *Score* III (B, F e G), *Score* IV (C, D, E, H, I e J).....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da claudicação (%) de acordo com Fossum, 2008. Animais dos grupos controle (GC) e tratados com células-tronco (GT) no período pré e pós-operatório.....	31
Tabela 2 - Classificação da ossificação (%) de acordo com Hoffmann et al. (2006) dos animais dos grupos controle (GC) e tratados com células-tronco (GT) ao longo do período de avaliação. Teste Qui-quadrado com nível de significância $p \leq 0,05$, entre os mesmos períodos para os diferentes grupos	33
Tabela 3 - Desvio padrão e erro padrão da média da densidade das trabéculas da substância esponjosa (%) nos grupos controle (GC) e tratado (GT). Foi aplicado o teste de Mann Whitney para os grupos em cada período. Asterisco na coluna, entre as diferentes linhas expressa diferença estatística $p \leq 0,05$	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina Aminotransferase
APT	Ângulo do Platô Tibial
AFJ	Ângulo de Flexão do Joelho
CTMs	Células-Tronco Mesenquimais
DAD	Doença Articular Degenerativa
GC	Grupo Controle
GT	Grupo Tratado
LCC	Ligamento Cruzado Cranial
RLCC	Ruptura do Ligamento Cruzado Cranial
TPLO	Osteotomia de Nivelamento do Platô Tibial
TTA	Avanço da Tuberosidade Tibial

RESUMO

USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS, DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSE, NA REPARAÇÃO DA OSTEOTOMIA APÓS AVANÇO DA TUBEROSIDADE TIBIAL EM CÃES

Clarissa Rocha dos Santos¹ e Eduardo M. Mendes de Lima²

1 – Médica Veterinária, Mestranda em Saúde Animal, Universidade de Brasília, Brasil

2 – Professor Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasil

E-mail: limaemm@unb.br

A ruptura do ligamento cruzado cranial é a afecção ortopédica mais comum entre os cães. Dentre as diversas técnicas para tratamento desta afecção, o avanço da tuberosidade tibial tem sido empregada para se obter uma rápida recuperação do joelho afetado. Uma desvantagem desta técnica é a formação de um espaço ósseo que se forma entre a tuberosidade tibial e a epífise proximal da tíbia após a realização da osteotomia. Normalmente este espaço ósseo pode levar mais de quatro meses para se consolidar. Estudos afirmam que a utilização de células-tronco pode aumentar a reparação de defeitos ósseos críticos em animais, mas a recuperação óssea com o auxílio de células-tronco após osteotomias corretivas no tratamento da ruptura do ligamento cruzado cranial ainda não foi totalmente comprovada. Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade do uso de células-tronco mesenquimais implantadas no sítio de osteotomia obtido pelo de avanço da tuberosidade tibial em 9 cães diagnosticados com RLCC. No mesmo procedimento foram coletados, de todos os animais, um fragmento de tecido adiposo para envio ao laboratório e extração das células tronco mesenquimais. O estudo foi realizado em duplo-cego, sem que o médico veterinário ou o proprietário soubessem quais animais iriam receber células tronco e quais animais receberiam placebo. Os animais foram divididos em dois grupos. No grupo tratado os animais receberam meio de transporte celular contendo células-tronco devidamente cultivadas e o grupo controle recebeu somente o meio de transporte celular. Uma parte das células permaneceu no laboratório e foi induzida à diferenciação celular para

tecido ósseo. Outra parte das células foi enviada para o laboratório MOFA nos Estados Unidos da América a fim de realizar a caracterização molecular. Foram realizadas radiografias seriadas após 15, 30, 60, 90 e 120 dias do procedimento. A avaliação da densidade do osso trabecular a partir da substância esponjosa foi feita usando o software Adobe Photoshop CS6, analisando as imagens de raios-x. Posteriormente as imagens dos dois grupos foram processadas pelo software Image-Pro Plus 4.1. Realizou-se a análise estatística descritiva para obtenção da média e do desvio padrão e do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Em ambas as avaliações, foi possível observar que o grupo controle obteve melhores resultados que o grupo tratado somente nos primeiros 30 dias, não obtendo diferença estatística nos demais períodos. Possivelmente obteve-se um atraso no período de diferenciação, justificável devido à necessidade de reorganização decorrente do processo inflamatório após a introdução das células tronco.

PALAVRAS-CHAVE: Avanço da tuberosidade tibial, células-tronco, ligamento cruzado, joelho.

ABSTRACT

USE OF ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IN REPAIR OF OSTEOTOMY AFTER TIBIAL TUBEROSITY ADVANCEMENT IN DOGS

The cranial cruciate ligament rupture (CCLR) is the most common orthopedic affection in dogs. Studies state that the use of stem cells can increase the repair of critical bone defects in large animals, but the bone recovery using stem cells after corrective osteotomies in CCLR treatment has not been totally proven yet. This study had an objective to evaluate the viability of using mesenchymal stem cells (MST) implanted on osteotomy site through the tibial tuberosity advancement in 9 dogs has been diagnosed with CCLR. At the same procedure was collected, from all animals, a fat tissue fragment to be sent to the laboratory and extraction of the mesenchymal stem cells. The study was double-blinded, without the knowledge of what animals would receive the stem cells treatment by the veterinarian neither by the owner. The animals were splitted in two groups, the treated group and the control group. The treated group received the stem cells properly cultivated and the control group received only the transport solution where the stem cells were forwarded. A portion of the cells remained at lab and was induced to differentiation of the bone cells. Another portion of the cells was sent to the MOFA lab at United States of America to perform molecular characterization. Serial x-rays were performed after 15, 30, 60, 90 and 120 days of procedure. The density evaluation of the trabecular bone from spongy substance was done using the software Adobe Photoshop CS6, analyzing the x-ray images. Posteriorly, the images from the two groups was processed by the software Image-Pro Plus 4.1. It was carried out the descriptive statistics analysis to obtain the mean and the standard deviation and the Kolmogorov-Smirnov normality test. In both evaluation was possible to observe that control group obtained better results than treated group in the first 30 days, not obtaining statistical differences in the other periods. Possibly it can be explained by the delay in the period of cell differentiation owing the necessity of reorganization due the inflammatory process after the stem cell introduction.

KEY WORDS: tibial tuberosity advancement, stem cells, cruciate ligament, knee.

INTRODUÇÃO

O ligamento cruzado cranial (LCC) é composto por duas bandas, a craniomedial e a caudolateral (Fossum 2008). A principal função desse ligamento é a estabilização do joelho, impedindo movimentos de deslocamento cranial da tíbia em relação ao fêmur, além dos movimentos de rotação da tíbia (Vezin et al. 2004, Fossum 2008, Calvo et al. 2014).

A ruptura do ligamento cruzado cranial (RLCC) é a afecção ortopédica de joelho que mais acomete os cães (Marino & Loughin 2010, Calvo et al. 2014). As causas que levam a RLCC ainda não estão completamente definidas (Vedrine et al. 2013), mas fatores presumíveis levam a uma via comum da origem dessas lesões (Cook 2010). Dentre as hipóteses traumáticas, 20% das lesões são decorrentes da rotação excessiva do joelho ou da própria hiperextensão (Griffon 2010). Apesar das lesões serem primariamente traumáticas, outros fatores degenerativos têm sido apontados na patogênese dessa afecção como, idade, sexo e obesidade (Venzin et al. 2004), além da predisposição racial, aberrações de conformação, mecanismos imunomediados e alterações como inflamação (Griffon 2010). As técnicas extra capsulares usualmente aplicadas para o tratamento desta afecção são: sutura fabelo-tibial, osteotomia de nivelamento do platô tibial (TPLO) e avanço da tuberosidade tibial (TTA). Além destas, existem técnicas intracapsulares que consistem basicamente na passagem de tecido autógeno ou sintético através de orifícios realizados no fêmur, na tíbia ou em ambos, através de um método denominado “over-the-top” (acima do topo). O material usado mais comumente é a fásia lata autógena. Os materiais sintéticos, não tem sido amplamente utilizados devido à possibilidade de distensão, rupturas ou infecção (Fossum 2008).

A TTA demonstra excelentes resultados (Hoffmann et al. 2006), não altera a geometria original da articulação do joelho e promove a distribuição da pressão na cartilagem, além disso, é um procedimento cirúrgico mais simples com menor potencial para gerar efeitos adversos por problemas técnicos (Boudrieau 2009). A utilização desta técnica com a aplicação de células-tronco vem promover uma nova perspectiva para o tratamento da afecção. A formação e reparação do osso são realizadas pelas células osteoprogenitoras derivadas das células tronco mesenquimais (CTMs) que atuam na área de lesão por meio da sinalização das citocinas que estimulam a se replicarem e diferenciarem em osteoblastos ativos que expressam mRNAs da proteína de matriz óssea e depositam matriz extracelular mineralizada com hidroxapatita

confirmando que elas se tornam células formadoras de osso, além disso, respondem a estímulos mecânicos para recompor a função do esqueleto (Kraus & Kirker-Head 2006). Além disso, as CTMs também mantêm a viabilidade e o potencial multilinhagem após a criopreservação, portanto, CTMs podem ser efetivamente isoladas, expandidas, preservadas e implantadas (Kraus & Kirker-Head 2006).

Kang et al. em 2012 demonstraram que as CTMs originadas do tecido adiposo têm um potencial de proliferação mais elevada do que os outros tipos de CTMs e suas principais vantagens estão relacionadas a fácil obtenção, disponibilidade em quantidades substanciais e podem ser colhidas sem riscos para o doador. Além disso, são células que crescem de forma estável in vitro e tem uma elevada taxa de expansão (Schäffler & Büchler 2007). O diferencial destes processos é que as CTMs, além da sua capacidade de influenciar o funcionamento dos osteoblastos, aumentam a quantidade de células mobilizadas e a taxa de crescimento e deposição de matriz óssea (Horwitz et al. 1999). Sendo eficientes para procedimentos de reparo ósseo (Kang et al. 2012).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade do emprego de CTMs implantadas no sítio de osteotomia obtido durante a técnica de TTA em cães com diagnóstico comprovado de RLCC. Avaliou-se clinicamente ainda a recuperação dos cães após o emprego da técnica de TTA e implante de CTMs no sítio de osteotomia e radiograficamente o preenchimento do sítio de osteotomia após o implante de CTMs.

REVISÃO DE LITERATURA

1. LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL

O ligamento cruzado cranial (LCC) estende-se diagonalmente através do espaço articular e liga-se à área intercondilar cranial do platô tibial (Muir et al. 2010). O local de fixação tibial é limitado cranialmente pelo ligamento meniscotibial cranial do menisco medial e caudalmente pelo ligamento meniscotibial cranial do menisco lateral (Muir et al. 2010). É composto por duas bandas, a craniomedial e a caudolateral (Fossum 2008, Muir et al. 2010). A subdivisão craniomedial surge proximalmente ao fêmur e se insere mais cranialmente na área de fixação tibial, em comparação com a subdivisão caudolateral (Figuras – 1 A e B). As fibras do componente caudolateral originam-se da parte mais lateral e distal da área de fixação do côndilo femoral lateral e inserem-se na região mais caudal da área de fixação tibial (Muir et al. 2010). Os ligamentos cruzados são compostos de células e matriz extracelular rica em água (60-80%) (Muir et al. 2010, Comerford et al. 2011). Do peso seco dos ligamentos cruzados, 90% é colágeno (principalmente tipo I), com menor quantidade de elastina, proteoglicanos, glicoproteínas e lipoproteínas (Muir et al. 2010, Comerford et al. 2011). A principal função desse ligamento é a estabilização do joelho, impedindo movimentos de deslocamento cranial da tíbia em relação ao fêmur, além dos movimentos de rotação da tíbia (Vezin et al. 2004, Fossum 2008, Muir et al. 2010, Calvo et al. 2014). Os dois componentes do LCC não são isométricos, sendo a principal diferença o alongamento da banda craniomedial e o encurtamento do componente caudolateral durante a flexão, o primeiro é o maior contribuinte para a estabilidade craniocaudal na flexão do joelho e o último só contribui quando a faixa craniomedial é danificada ou severamente esticada (Muir et al. 2010).

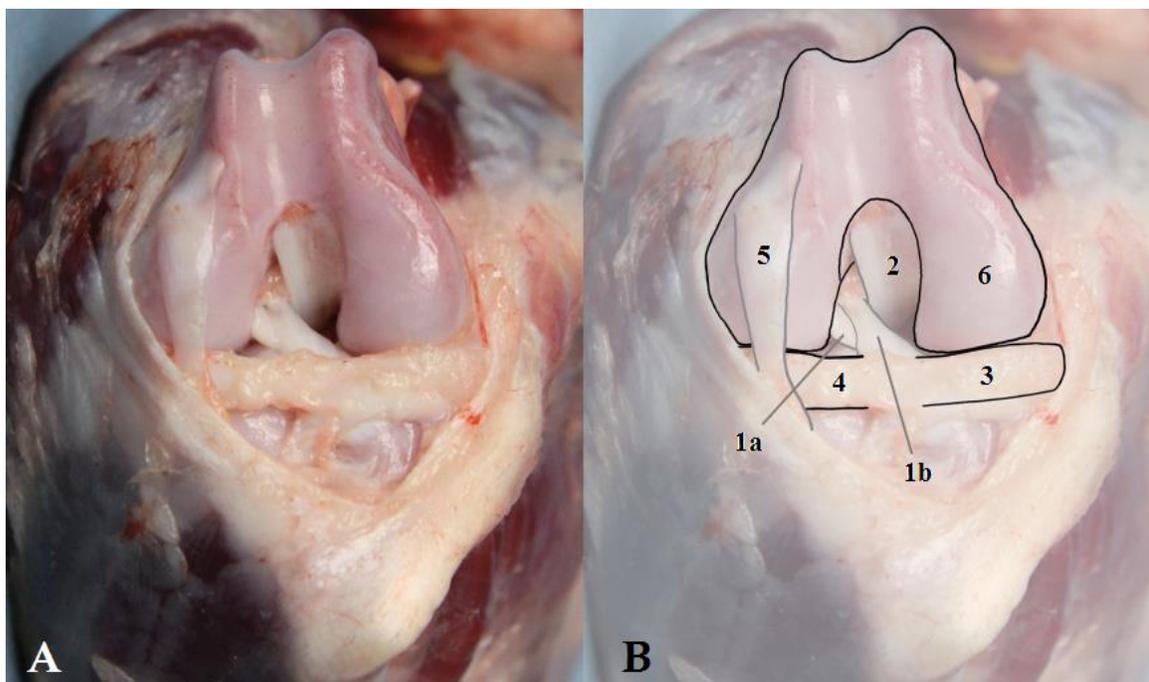


Figura 1 - (A) Fotografia e (B) desenho de um joelho flexionado de um cão. Vista cranial após remoção da gordura infrapatelar. 1a: banda caudolateral do LCC; 1b: banda craniomedial do LCC; 2: ligamento cruzado caudal; 3: menisco medial; 4: menisco lateral; 5: tendão do músculo extensor digital longo; 6: côndilo femoral medial (Muir et al. 2010)

A RLCC é a afecção ortopédica de joelho que mais acomete os cães (Marino & Loughin 2010, Vedrine et al. 2013, Calvo et al. 2014, Duerr et al. 2014). As causas que levam a RLCC ainda não estão completamente definidas (Comerford et al. 2011, Vedrine et al. 2013), mas fatores presumíveis levam a uma via comum da origem dessas lesões (Cook 2010). Dentre as hipóteses traumáticas, 20% das lesões são decorrentes da rotação excessiva do joelho ou da própria hiperextensão (Griffon 2010). Apesar das lesões serem primariamente traumáticas, outros fatores degenerativos têm sido apontados na patogênese dessa afecção como idade, sexo e obesidade (Vezin et al. 2004, Comerford et al. 2011), além da predisposição racial, aberrações de conformação, mecanismos imunomediados e alterações como inflamação (Griffon 2010, Comerford et al. 2011). Um estudo examinando uma população de 328 cães encontrou que a idade média de ruptura do LCC em raças grandes (peso corporal maior que 15 kg) foi de 5,5 anos, enquanto que as raças menores (peso corporal menor que 15 kg), em média, 7,4 anos (Comerford et al. 2011). A ruptura parcial ou completa do LCC causa instabilidade na articulação

do joelho e desencadeia uma cascata de alterações patológicas secundárias, incluindo osteoartrite progressiva e subsequente lesão meniscal (Vedrine et al. 2013).

O diagnóstico é baseado no histórico clínico, e embora os proprietários forneçam frequentemente uma história sugestiva de trauma, a análise física cuidadosa revelará geralmente que o início da claudicação era insidiosa ou que a claudicação foi observada pelo proprietário após um incidente de menor trauma associado com atividade diária normal, mas é comum observar que a grande maioria de cães não têm histórico de trauma óbvio (Muir et al. 2010).

Acredita-se, que a RLCC está possivelmente associada a uma artropatia de joelho preexistente, sendo a duração da claudicação descrita pelos proprietários altamente variável e também é comum que os cães não respondam à terapia médica com drogas antiinflamatórias não esteróides após identificação de uma claudicação pélvica mais sutil (Muir et al, 2010).

Ao exame físico, os cães afetados tipicamente exibem claudicação unilateral. Se a claudicação é bilateral, os cães geralmente se inclinam para frente e alteram sua postura, rotação externa do membro afetado pode ser evidente ao caminhar e a atrofia da musculatura do(s) membro(s) pélvico(s) afetado(s) é geralmente visível (Muir et al. 2010). Um exame físico cuidadoso é importante, uma vez que uma doença neurológica pode inicialmente ser suspeitada em cães que têm dificuldade em subir de uma posição sentada para uma posição de pé por causa da RLCC (Muir et al. 2010). A instabilidade crânio-caudal entre a tibia e o fêmur pode ser identificada pelo teste de gaveta ou pelo teste de compressão tibial (Figura - 2 A e B) (Hoffmann et al. 2006, Muir et al. 2010), contudo, crepitação e dor também podem ser encontradas na flexão e extensão à medida que esses testes são realizados (Muir et al. 2010). Tais exames podem não ser conclusivos e assim é possível utilizar exames complementares que auxiliem o diagnóstico como as radiografias, ultrassom e ressonância magnética (RM) (Marino & Loughin 2010).

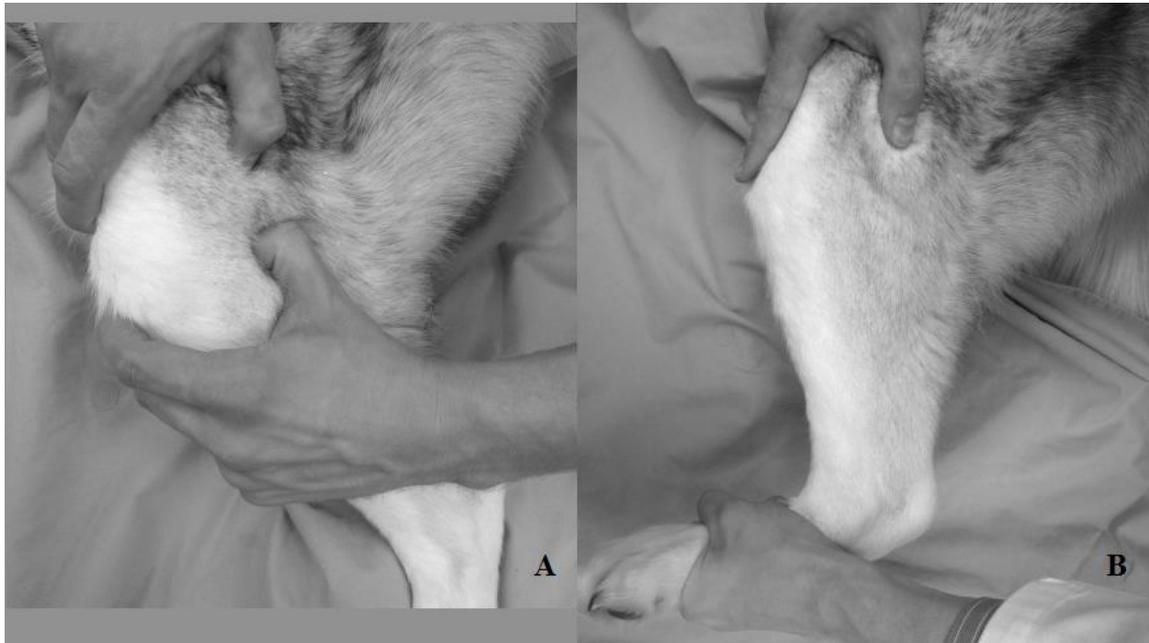


Figura 2 - (A) Posicionamento para realizar teste de gaveta. Deve-se colocar o dedo indicador na crista tibia e odedo polegar na cabeça da fíbula, e a com a outra mão o dedo indicador apoiado na patela e o dedo polegar na fabela lateral. (B) Posicionamento para realizar teste de compressão tibial. Deve-se colocar um dedo indicador na crista tibial para determinar se o deslocamento cranial da tibia ocorre quando o jarrete é flexionado com a outra mão (Muir et al. 2010).

Evidências radiográficas podem incluir efusão intra-articular, deslocamento cranial da tibia na incidência médio-lateral com compressão e flexão do tarso a 90° resultando em sinal de Cazieux positivo (Marino & Loughin 2010, Muir et al. 2010). O diagnóstico de RLCC pode ser feito com o auxílio do ultrassom demonstrando que as bordas da ruptura do ligamento vibram, entretanto, é possível injetar solução salina a fim de criar um imagem mais anecóica caso o porção gordurosa infra-patelar dificulte a visualização do ligamento (Marino & Loughin 2010). A utilização da ultrassonografia possui limitações significativas na rotina veterinária, pois os joelhos de cães pequenos e de médio porte são muito estreitos, produzindo imagens de baixa qualidade para um diagnóstico efetivo, além disso, existem meios diagnósticos alternativos mais eficientes que o próprio ultrassom, como ressonância magnética (RM) (Marino & Loughin 2010).

2. TÉCNICAS CIRÚRGICAS DE CORREÇÃO

Embora alguns cães possam retornar a níveis aceitáveis de atividade sem cirurgia, a instabilidade causada pela RLCC é frequentemente tratada cirurgicamente (Dunn et al. 2012). Sendo assim, numerosas técnicas cirúrgicas têm sido descritas para tratá-la (Harper et al. 2004,

Vedrine et al. 2013), cada uma com vantagens e desvantagens potenciais ou comprovadas (Vedrine et al. 2013). No entanto, não foi demonstrada que qualquer técnica impeça de forma consistente o desenvolvimento ou a progressão de doenças articulares degenerativas (DAD) (Harper et al. 2004). Os objetivos das cirurgias são proporcionar retorno da função mecânica, alívio da dor e prevenção de lesões secundárias no menisco (Harper et al. 2004), além de prevenir ou minimizar o desenvolvimento de DAD e buscar estabilidade (Harper et al. 2004, Fossum 2008). As técnicas cirúrgicas são divididas em procedimentos intracapsulares e extracapsulares (Harper et al. 2004, Hoffmann et al. 2006), sendo que as extracapsulares serão vantajosas quando os reparos intracapsulares não puderem ser utilizados, falharem ou forem identificadas infecções articulares (Harper et al. 2004). Uma pesquisa demonstrou que a maioria dos cirurgiões veterinários preferiu técnicas extracapsulares para o reparo de RLCC em cães (Harper et al. 2004). Porém, o método mais apropriado deve ser escolhido de acordo com a preferência do cirurgião, assim como o tamanho do animal, a atividade desenvolvida pelo paciente e os custos dos procedimentos (Fossum 2008).

As técnicas intracapsulares consistem basicamente em um método denominado “over-the-top” que utiliza enxertos sintéticos ou autógenos da fáscia lata (Fossum 2008). E as técnicas extracapsulares usualmente aplicadas para o tratamento desta afecção são sutura fabelotibial, a osteotomia de nivelamento do platô tibial (TPLO) e o avanço da tuberosidade tibial (TTA) (Fossum 2008).

2.1. Técnicas intracapsulares

Consistem na passagem de tecido autógeno ou sintético através de orifícios realizados no fêmur, na tíbia ou em ambos, através de um método denominado “over-the-top” (acima do topo) (Fossum 2008). O material usado mais comumente é a fáscia lata autógena e apesar de existirem outras opções como os materiais sintéticos, esses não tem sido amplamente utilizados devido à possibilidade de distensão, rupturas ou infecções (Fossum 2008). Além desse método, diversas modificações da técnica utilizando a fáscia lata já foram descritas, mas em uma pesquisa clínica que comparou a estabilização intra-capsular com as osteotomias extracapsulares como tratamentos para a RLCC em cães, nenhuma das técnicas intracapsulares resultou em retorno normal à função após 6 meses do procedimentos cirúrgico, além disso, tais técnicas apresentaram resultados inferiores aos das técnicas extra-capsulares (Dunn et al. 2012).

2.2. Técnicas extracapsulares

2.2.1. Sutura fabelo-tibial

A estabilização do joelho com RLCC utilizando a sutura fabelo-tibial é uma técnica antiga e continua sendo bastante utilizada, pois é tecnicamente menos exigente, requer implantes mínimos e produz resultados clínicos que não foram claramente demonstrados, sendo inferiores a outras técnicas (Dunn et al. 2012). Além disso, é a reparação extra-articular mais descrita para a correção da RLCC (Nwadike & Roe 1998). É uma técnica que utiliza um fragmento de fásia lata suturada a si mesma, passando pelo ligamento femorofabelar lateral e tem sido utilizada com sucesso em cães de raça média a grande (Harper et al. 2004). Além da sua fácil execução, baixo índice de complicações, pois efetivamente estabiliza a articulação do joelho e promove repetidamente um resultado bem-sucedido (Harper et al. 2004). Outra técnica comum de sutura extracapsular que visa a restrição do movimento de gaveta, consiste na perfuração de orifícios na tíbia e nos côndilos femorais e em seguida a passagem de material sintético ou autólogo para a estabilização do joelho (Guénégo et al. 2007).

Embora bons resultados a médio e longo prazo tenham sido relatados após estes procedimentos, existem vários problemas potenciais que podem estar relacionados com a técnica cirúrgica, estes incluem uma recuperação imprevisível a curto prazo, falha prematura de sutura, instabilidade contínua, osteoartrite progressiva, lesão de menisco subsequente ao procedimento e infecção (Dunn et al. 2012).

2.2.2. Osteotomia de nivelamento do platô tibial (TPLO)

Consiste em uma técnica que visa à diminuição do ângulo do platô tibial (APT) (Boudrieau 2009, Muir et al. 2010) ao converter a translação tibial cranial em um deslocamento tibial caudal prevenindo a subluxação (Muir et al. 2010), controlando a compressão tibial e atingindo uma estabilização através da contenção ativa da articulação, que normalmente é alcançada pelos músculos e tendões (Boudrieau 2009). Ao ser aplicada a técnica, a inclinação do platô tibial é reduzida de modo que a compressão tibial seja alterada de uma posição cranioproximal para uma posição neutra ou caudal (Boudrieau 2009). Foi relatado que TPLO estabiliza funcionalmente a articulação do joelho durante o suporte de peso, neutralizando a força de cisalhamento tibiofemoral cranial pela redução do APT, isto é conseguido por osteotomia da face proximal da tíbia e rotação de tal fragmento (Figura 3) (Boudrieau 2009).

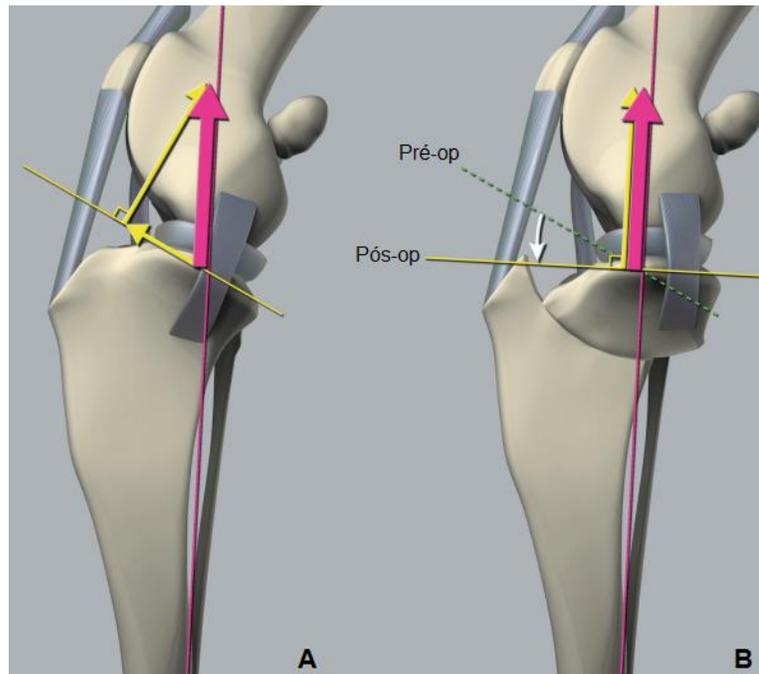


Figura 3 - Representação esquemática das forças tibiofemorais da articulação de um joelho antes (A) e após (B) a osteotomia de nivelamento do platô tibial (TPLO). Para aplicação dessa técnica considera-se que a força de reação articular (seta rosa) na articulação do joelho é aproximadamente paralela ao eixo longitudinal da tíbia. (A): Em um joelho com RLCC a força de reação articular pode ser dividida em um componente de cisalhamento tibiofemoral dirigido cranialmente, paralelo ao platô tibial (seta amarela) e uma força de compressão articular, perpendicular ao platô tibial (seta amarela). (B): Após nivelar o platô tibial, o vetor de força de cisalhamento tibiofemoral torna-se zero, e a força de compressão articular e a força resultante tornam-se uma só (Setas rosa e amarela) (Muir et al. 2010).

2.2.3. Avanço da tuberosidade tibial (TTA)

É uma técnica que visa eliminar a compressão da tíbia através do posicionamento do tendão patelar perpendicular às forças de cisalhamento do joelho, ou seja, a TTA posiciona o ligamento patelar perpendicularmente à inclinação do platô tibial, avançando a inserção desse ligamento cranialmente, eliminando a força de cisalhamento e aliviando a função do LCC (Figura 4) (Lafaver et al. 2007, Boudrieau 2009). Durante a realização da técnica, é necessária a

realização de uma osteotomia na tuberosidade da tíbia formando um espaço ósseo, o qual é preenchido totalmente por tecido ósseo ao longo de 8 a 10 semanas de pós-operatório (Hoffmann et al. 2006).

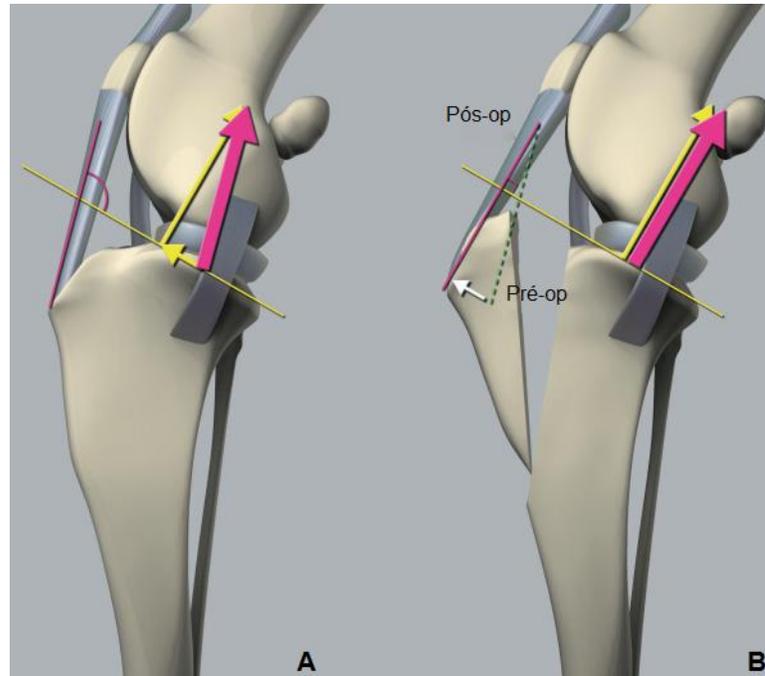


Figura 4 - Representação esquemática das forças tibiofemorais da articulação de um joelho antes (A) e após (B) o avanço da tuberosidade tibial (TTA). Para aplicação dessa técnica considera-se que a força de reação articular (seta rosa) é aproximadamente paralela ao tendão patelar. (A): No joelho com RLCC a força de reação articular pode ser dividida em um componente de cisalhamento tibiofemoral dirigido cranialmente (seta amarela) e uma força de compressão articular perpendicular ao platô tibial (seta amarela). (B): Ao avançar a tuberosidade tibial cranialmente, o tendão da patela torna-se perpendicular ao platô tibial. A força de reação articular (seta rosa), portanto, torna-se perpendicular ao platô tibial durante o suporte de peso e, portanto, se iguala a força de compressão articular (seta amarela) e o deslocamento tibial cranial é eliminado (Muir et al. 2010).

3. AVANÇO DA TUBEROSIDADE TIBIAL (TTA)

A TTA demonstrou excelentes resultados (Hoffmann et al. 2006), além disso é um procedimento cirúrgico mais simples com menor potencial para gerar efeitos adversos por problemas técnicos (Boudrieau 2009). A TTA pareceu restaurar o contato e a pressão femoro-

tibial normal (Kim et al. 2009), o que pode poupar o menisco do risco de um trauma após a realização dessa técnica. O trabalho de Kim et al. 2009 também sugeriu que, como a TTA não altera a geometria da articulação e nem a distribuição de pressão, pode haver menos desenvolvimento de osteoartrite ao longo do tempo.

3.1. Escolha da técnica

Vários fatores específicos da configuração anatômica do membro devem ser considerados antes da seleção desta técnica cirúrgica (Boudrieau 2009), dentre eles:

3.1.1. Ponto de inserção do tendão patelar alto e baixo

A tuberosidade tibial pode ter um risco maior de fratura com TTA nos casos em que o ponto de inserção do tendão patelar é mais baixo, uma vez que a placa é aplicada à crista da tibia e a posição do *cage* está acima da posição mais proximal da placa com pouco osso presente para suporte. Em cães com ponto de inserção mais elevado o TTA é preferível, uma vez que uma placa maior pode ser aplicada à crista da tibia e o *cage* permanece apoiado com quantidade de osso adequada (Figura 5). Contudo, não existem estudos experimentais ou clínicos que apoiem estas hipóteses (Boudrieau 2009, Muir et al. 2010).

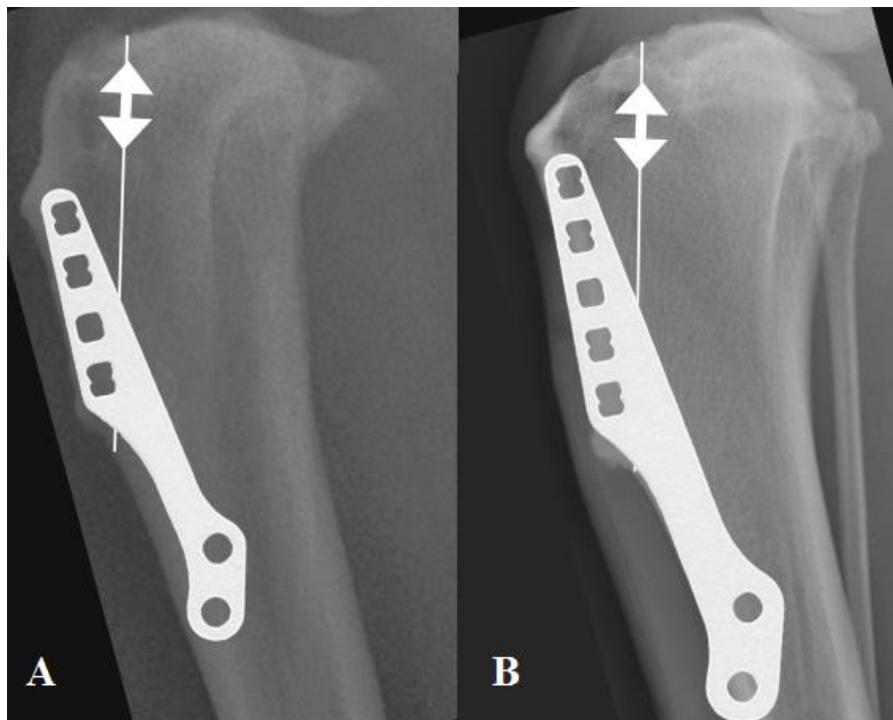


Figura 5 - Radiografias laterais da articulação do joelho demonstrando a variação entre os pontos de inserção do tendão patelar na tuberosidade tibial. (A) tuberosidade tibial com ponto de inserção

baixo, e (B) tuberosidade tibial com ponto de inserção alto. A posição do *cage* é demonstrada pelas setas com duas pontas (Muir et al. 2010).

3.1.2. APT aumentado

Os casos em que há um aumento do APT não são propícios a TTA (Figura 6). Sabe-se que o APT alvo é de 90° e alcançar esse ângulo provavelmente exigirá um avanço além do obtido com os implantes atualmente disponíveis, entretanto o ângulo máximo do platô tibial para realizar uma TTA ainda não foi determinado (Boudrieau 2009, Muir et al. 2012). Já foram relatados procedimentos bem sucedidos que foram realizados em cães com inclinação aproximada de 30° e proposto que ângulos maiores do que esses provavelmente não são adequados para aplicação da técnica de TTA (Boudrieau 2009, Muir et al. 2012).

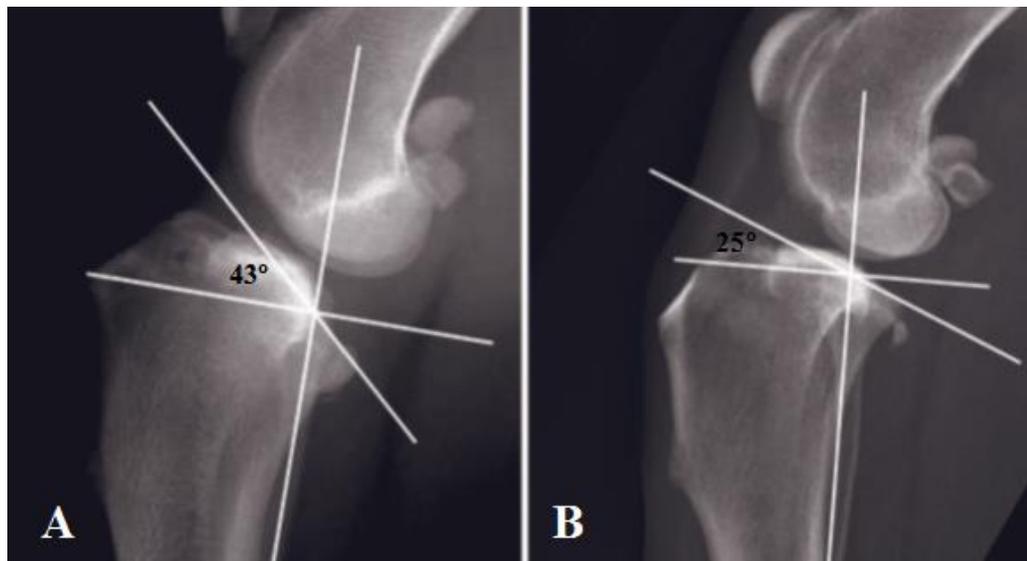


Figura 6 - Radiografias médio-laterais do joelho de um cão demonstrando diferenças no APT. Em (A) é considerado excessivo com 43° e em (B) dentro do limite normal com 25°. Se comparada com (B), a inclinação do APT em (A) coloca a articulação numa posição relativamente de hiperextensão e a TTA não corrige essa alteração, pois o APT permanece inalterado (Boudrieau 2009).

3.1.3. Deformidades angulares e torções dos membros

As deformidades angulares e torções podem ser tratadas com TTA, contudo, é necessária outra osteotomia para a correção de qualquer deformidade tibial vara, valga ou torção (Boudrieau 2009, Muir et al. 2010). A desvantagem de realizar outra osteotomia é que a porção medial do osso já possuirá a placa de TTA no terço proximal da tíbia, o que interferirá com a posterior fixação da placa adicional (Boudrieau 2009, Muir et al. 2010). Embora uma placa

padrão possa ser aplicada sobre a fina placa de TTA, isso não é ideal e geralmente não é recomendado nestas circunstâncias (Boudrieau 2009, Muir et al. 2010).

3.1.4. Tamanho do paciente

A TTA já foi realizada em cães de 5 kg até 83 kg (Hoffmann et al. 2006, Lafaver et al. 2007), mas a limitação para a escolha do tamanho do animal depende da disponibilidade de implantes adequados (Boudrieau 2009, Muir et al. 2010). Os implantes são produzidos em uma variedade de tamanhos, de modo que eles podem ser usados em quase todos os tamanhos de cães (Boudrieau 2009, Muir et al. 2010). Em casos de raças muito grandes, como a dogue alemão, uma das limitações pode não ser o peso do animal, mas sim a altura (Boudrieau 2009, Muir et al. 2010).

3.2. Planejamento cirúrgico

3.2.1. Posicionamento radiográfico pré-operatório

Radiografias médio-laterais pré-operatórias, utilizadas posteriormente para fazer medições relacionadas ao planejamento e à técnica cirúrgica, devem ser realizadas com o feixe centrado no joelho e o ângulo de flexão do joelho (AFJ) deve ser de 135° com erro de 5° para mais ou menos (Hoffmann et al. 2006, Lafaver et al. 2007, Cadmus et al. 2014), com o intuito do estabelecimento de um posicionamento perfeito, que é confirmado através da sobreposição de ambos os côndilos femorais (Lafaver et al. 2007). As radiografias devem incluir todo o fêmur e tibia e quando não for possível, o trocânter menor e a tibia distal (Hoffmann et al. 2006, Lafaver et al. 2007, Cadmus et al. 2014), assim, o AFJ será medido como o ângulo formado entre as linhas traçadas a partir do ponto médio do eixo femoral ao nível do trocânter menor até à eminência intercondilar tibial e desta eminência ao ponto médio tibial mais distal (Figura 7) (Cadmus et al. 2014).



Figura 7 - Ângulo de flexão do joelho (AFJ): Imagem radiográfica médiolateral do joelho de um cão demonstrando que o AFJ é medido na intersecção de uma linha que se origina do ponto médio do fêmur ao nível do trocânter menor e se estende até a eminência intercondilar e uma linha que se origina no ponto médio mais distal na tíbia até a eminência intercondilar (Cadmus et al. 2014).

3.2.2. Definição do platô tibial

O platô tibial é definido por uma linha traçada entre pontos desenhados nas margens articular mais cranial e caudal do platô medial tibial, assim o APT é definido como o ângulo criado por uma linha perpendicular traçada ao longo da margem cranial do tendão patelar quando se insere na tuberosidade tibial e uma linha traçada ao longo do platô tibial (Figura 8) (Cadmus et al. 2014).



Figura 8 - O platô tibial é definido por uma linha que une pontos em suas margens articulares cranial e caudal (círculos laranjas). O ângulo do tendão patelar de 90° é estabelecido estendendo-se uma linha que é perpendicular ao platô tibial até o ponto de origem do tendão patelar ao longo da borda cranial da patela (Cadmus et al. 2014).

3.2.3. Escolha do *cage*

A técnica ideal utilizada para medir o avanço requerido para obter um APT de 90° ainda é controversa, alguns veterinários utilizam sobreposições transparentes para medir o avanço necessário (Figura 9), enquanto outros usam software de imagem, entretanto, evidências recentes sugerem que o método de sobreposição transparente tende a subestimar o tamanho do *cage* (Cadmus et al. 2014).

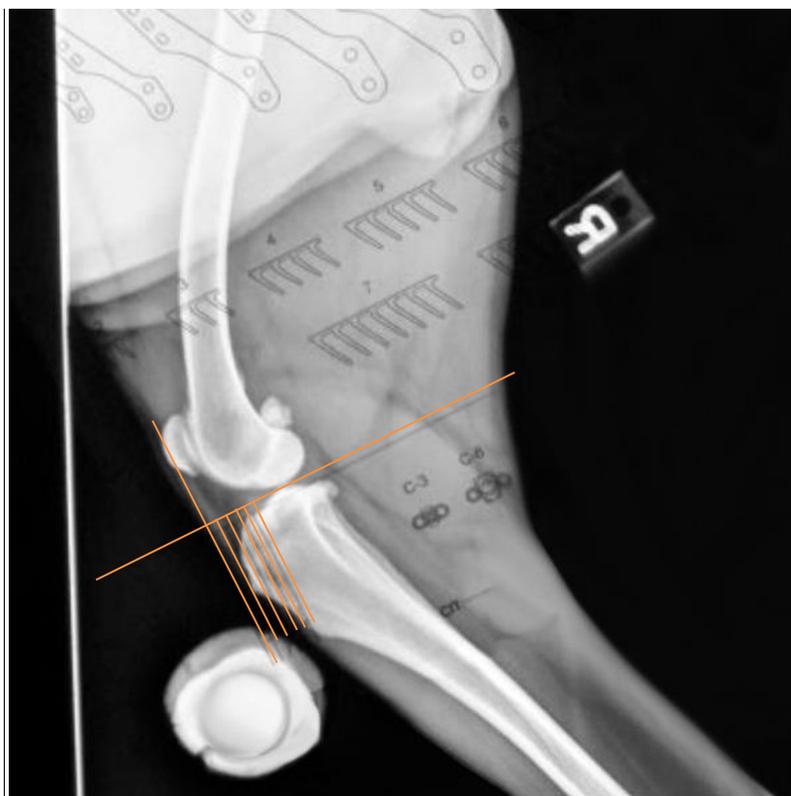


Figura 9 - Imagem radiográfica mediolateral do joelho de um cão demonstrando o uso da sobreposição transparente (template) para planejar o tamanho do *cage*. A sobreposição transparente foi usada de acordo com as instruções do fabricante (Cadmus et al 2014).

O método de sobreposição transparente utiliza um modelo fornecido comercialmente juntamente com os implantes e é sobreposto na linha do platô tibial para medir qual o avanço necessário para obter $APT = 90^\circ$ (Hoffmann et al. 2006, Cadmus et al., 2014). As linhas de avanço na sobreposição correspondem a *cages* de 6, 9 e 12 mm, determinando assim a estimativa da distância de avanço necessária (Figura 10) (Hoffmann et al. 2006, Cadmus et al. 2014), quando a tuberosidade tibial for posicionada entre as linhas de avanço do molde, as medidas devem ser estimadas para o número inteiro mais próximo, sendo este o tamanho do *cage* a ser utilizado, mas quando a medida do avanço exceder 12 mm, a recomendação do tamanho do *cage* é registrado como "não aplicável" (Cadmus et al. 2014).

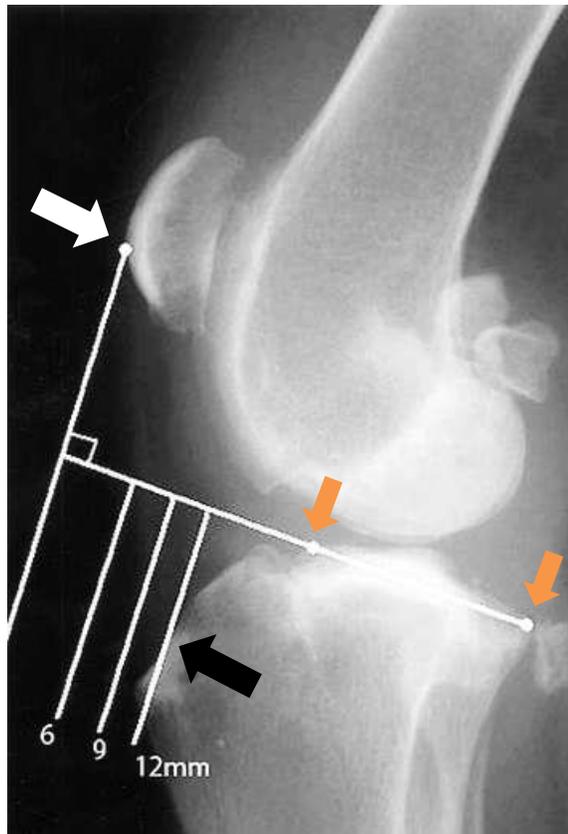


Figura 10 - Imagem radiográfica mediolateral do joelho de um cão demonstrando como determinar o avanço necessário e, assim, o tamanho do *cage*, dentre os tamanhos 6, 9 e 12 mm, para o TTA. Observe que os pontos de referência utilizados são os pontos de inserção dos ligamentos cruzados cranial e caudal (setas laranjas), a margem cranial da patela (seta branca) e a tuberosidade tibial (seta preta) (Hoffmann et al. 2006).

3.2.4. Escolha da placa

Utilizando o mesmo modelo transparente padronizado fornecido pelo fabricante dos implantes, define-se o tamanho das placas que devem cobrir toda a extensão da crista de tíbia, e em alguns casos é necessário alinhar a extremidade proximal da placa ligeiramente caudalmente (Figura 11) (Lafaver et al. 2007).

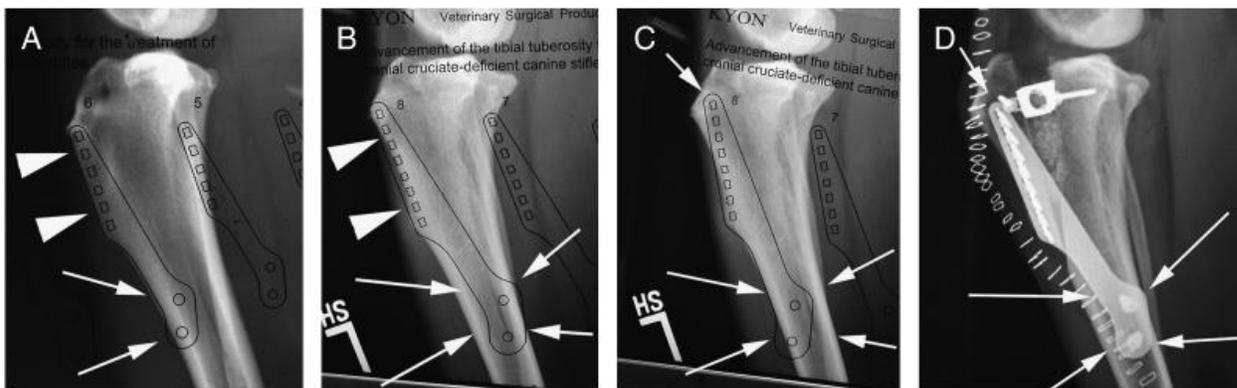


Figura 11 - (A) Na maioria dos cães a placa pode ser alinhada paralelamente à borda cranial da crista da tíbia (setas superiores), o que resulta em uma localização ligeiramente cranial da extremidade distal da placa (setas inferiores); (B) Em alguns cães a crista tibial não é tão proeminente distalmente e, portanto, o alinhamento do molde (e placa) paralelo à crista da tíbia (pontas das setas superiores) resultará em um alinhamento mais caudal da porção distal da placa em relação ao eixo central da tíbia antes do avanço (setas inferiores); (C) Alinhar o molde (e a placa) de modo que o aspecto proximal esteja posicionado mais caudalmente (seta curta superior) resultará em um alinhando ligeiramente cranial da porção distal da placa ao longo do eixo tibial (setas inferiores), esta é a posição desejada; (D) Radiografia pós-operatória mostrando a posição da placa (comparar com C; seta curta superior), após a TTA, a porção distal da placa se move caudalmente (setas inferiores) e agora repousa mais uma vez ao longo do eixo tibial (Lafaver et al. 2007).

3.2.5. Procedimento cirúrgico

De acordo com a técnica descrita por Hoffmann et al. 2006, após a preparação asséptica do membro deve ser realizada uma abordagem parapatelar medial na articulação do joelho e uma artrotomia craniomedial em todos os casos para avaliar o grau de lesão dos meniscos. O procedimento de TTA deve ser então realizado de acordo com a técnica descrita anteriormente por Montavon et al. 2002, utilizando equipamento comercialmente disponível. A elevação do terço proximal do periósteo medial da tíbia permite a realização de uma osteotomia longitudinal da crista tibial com uma lâmina de serra oscilante iniciando proximalmente e estendendo-se até a porção distal da crista da tíbia, mantendo a patela luxada lateralmente e protegendo o ligamento patelar utilizando-se de um elevador de periósteo. Uma placa deve ser aplicada na crista tibial, e fixada neste lugar. O *cage* cortado deve ser implantado no intervalo da osteotomia proximal paralelo à superfície da articulação, de 1 à 2 mm distal à superfície da articulação e fixado à tuberosidade e ao eixo tibial remanescente, empregando para tanto dois parafusos. A extremidade distal da placa deve ser fixada à face medial da tíbia com parafusos e o

local da articulação e da osteotomia lavado com solução fisiológica estéril. Os sítios cirúrgicos de artrotomia e osteotomia tibial devem ser fechados rotineiramente.

3.2.6. Pós-operatório

Radiografias pós-operatórias devem ser obtidas para avaliar a osteotomia e a posição da placa e *cage*. Além disso, todos os cães devem ser avaliados quanto a claudicação, bem como quaisquer outras complicações até que a cicatrização da fratura seja radiograficamente evidente (Lafaver et al. 2007).

4. USO DAS CÉLULAS-TRONCO

4.1. Células-tronco mesenquimais (CTMs)

Células-tronco são genericamente definidas como células indiferenciadas que são capazes de auto-renovação através da replicação, bem como a diferenciação em linhagens de células específicas (Fortier 2005). Tais células podem ser classificadas como embrionárias ou mesenquimais (adultas) dependendo da fase de desenvolvimento a partir da qual são obtidas (Fortier 2005).

O termo células-tronco mesenquimais (CTMs) refere-se a células progenitoras mesenquimais adultas com potencial para produzir células que se diferenciam em uma variedade de células mesenquimais, por exemplo, fibroblastos, mioblastos, osteoblastos, tenoblastos, adipócitos (Sell 2004, Schäffler & Büchle 2007, Kang et al. 2012, Monteiro et al. 2012), condrócitos e células neuronais (Kang et al. 2012). Elas podem ser isoladas no músculo, na pele, no sangue periférico, no tecido adiposo e na medula óssea, além disso, também produzem osteoclastos e osteoblastos responsáveis pela remodelação de osso e adipócitos, que compõem uma grande parte da medula óssea (Sell 2004, Fortier 2005, Kraus & Kirker-Head 2006, Lopez & Daigle 2013). Na medula óssea adulta, as CTMs têm cinco papéis principais: células progenitoras para a formação óssea durante a reparação de fraturas ósseas e para a renovação natural do osso, na formação de cartilagem, no suporte vascular, no suporte hematopoiético e como progenitores para adipócitos (Sell 2004).

4.2. Colheita, isolamento e caracterização

Fatores como idade do doador, tipo e localização do tecido adiposo, tipo de procedimento cirúrgico, condições de cultivo, densidade de revestimento e formulações de meios podem influenciar a taxa de proliferação e capacidade de diferenciação das células-tronco

(Schäffler & Büchle 2007). No entanto, uma vez que diferentes localizações anatômicas dos tecidos adiposos têm suas próprias características metabólicas, tais como atividade lipolítica, composição de ácidos graxos e perfil de expressão gênica, a fonte de enxertos de tecido adiposo subcutâneo (abdominal versus periférico) pode influenciar a longo prazo as características do enxerto de gordura (Schäffler & Büchle 2007). O tecido adiposo pode ser facilmente obtido por ressecção cirúrgica, lipoaspiração tumescente ou lipoaspiração assistida por ultrassom. As características metabólicas e a viabilidade das células de gordura parecem não diferir quando se compara a lipoaspiração padrão com a aspiração da seringa. O material obtido pela lipoaspiração ainda contém células viáveis e pode ser usado diretamente para a preparação de CTMs (Schäffler & Büchle 2007). O tecido adiposo total obtido por cirurgia primeiro deve ser microdissecado em condições estéreis para obter pequenos lóbulos de gordura (0,5 - 1cm³), contudo, tem de se considerar que o procedimento de isolamento pode afetar as células de gordura (Schäffler & Büchle 2007).

As técnicas de isolamento são geralmente baseadas nas propriedades aderentes das CTMs e a centrifugação por gradiente de densidade é utilizada inicialmente para separar as CTMs nucleadas (Kraus & Kirker-Head 2006, Lopez & Daigle 2013). À medida que as células são cultivadas, as CTMs aderem à superfície do frasco e as não aderentes são removidas quando o meio de cultura é trocado. A essa transferência das células dá-se o nome de **passagem**, e a multiplicação da população celular de **expansão**, produzindo por fim uma cultura pura (Kraus & Kirker-Head 2006, Lopez & Daigle 2013).

4.3. Células-tronco na reparação óssea

Os mecanismos embrionários de formação óssea implicam uma sequência de fatores celulares, humorais e mecânicos que resultam na formação de tecidos ósseos capazes de crescimento controlado, resposta estrutural ao estresse e reparação de lesão, sem cicatriz (Kraus & Kirker-Head, 2006). A sequência de eventos celulares no reparo de fraturas inclui a formação de um coágulo, migração de macrófagos e células mesenquimais para o local, formação de cartilagem na região da fratura e a ponte óssea via ossificação endocondral, sendo que as CTMs serão as responsáveis pela realização desses dois últimos eventos, além de desempenhar um papel osteogênico na remodelação óssea normal ou no reparo (Sell 2004).

Os processos naturais de reparação óssea são suficientes para efetuar a restauração oportuna da integridade óssea para a maioria das fraturas quando existe um ambiente mecânico adequado. Algumas situações requerem manipulação ou aumento de mecanismos naturais de cicatrização para regenerar grandes quantidades de osso novo do que naturalmente ocorre para atingir metas cirúrgicas (Kraus & Kirker-Head 2006). As situações específicas que podem requerer intervenções adicionais incluem perda substancial de osso do hospedeiro devido a trauma, artrodese, não-união, união retardada, doença metabólica, artroplastia ou potencial de cicatrização insuficiente do hospedeiro por doença local, sistêmica ou senilidade (Kraus & Kirker-Head 2006). Os materiais e estratégias que são empregadas devem duplicar e amplificar os eventos de união óssea secundária para alcançar o resultado desejado (Kraus & Kirker-Head 2006).

O osso pode ser regenerado através das seguintes estratégias: osteogênese (transferência de células), osteoindução (indução de células para se tornarem osso) osteocondução (proporcionando um arcabouço para células formadoras de osso) ou osteopromoção (promoção da cicatrização e regeneração óssea, estimulando o ambiente biológico ou mecânico dos tecidos cicatrizantes ou regeneradores) (Kraus & Kirker-Head 2006). As estratégias mais eficazes utilizam o maior número possível de componentes fundamentais da regeneração óssea e cada etapa da regeneração óssea depende de CTMs (Kraus & Kirker-Head 2006).

O reparo de muitas fraturas ocorre por união óssea secundária, que é uma progressão complexa das CTMs para sua progênie: condroblastos, condrócitos, fibroblastos e osteoblastos, que formam um calo na fratura óssea que interrompe a matriz e resulta em hemorragia (Kraus & Kirker-Head 2006). Em seguida, as citocinas da matriz e a desgranulação das plaquetas no local da fratura formam um meio de proteínas biologicamente ativas, algumas quimioatrativas para CTMs, que migram para a área de dano, essas então se proliferam e seguem as linhagens osteoblásticas, condroblásticas ou fibroblásticas, dependendo do ambiente do local da fratura (Kraus & Kirker-Head 2006). Os ambientes biológicos e mecânicos favoráveis resultam na proliferação e diferenciação de CTMs em osteoblastos e condrócitos, que produzem matriz criando um calo de fratura. O osteócito mineraliza e a cartilagem sofre ossificação endocondral que forma o osso em ponte no *gap* da fratura (Kraus & Kirker-Head 2006). Assim,

os eventos celulares da cicatrização óssea são a quimioatração, a migração, a proliferação e a diferenciação, sendo as CTMs os ancestrais fundamentais desse evento celular (Kraus & Kirker-Head 2006).

4.4. Uso das células-tronco de origem do tecido adiposo

O padrão ouro atual para a reparação de defeitos ósseos é o transplante de enxerto ósseo. Esta estratégia largamente utilizada resulta geralmente num resultado clínico positivo, mas tem muitas desvantagens incluindo morbidade significativa no local de coleta, fornecimento limitado de tecido ósseo, aumento da perda de sangue, procedimento cirúrgico adicional, diminuição do potencial osteogênico do osso enxertado, risco potencial de infecção e respostas imunes problemáticas após a implantação (Kang et al. 2012). Por estas razões, os procedimentos de engenharia de tecido ósseo utilizando uma combinação de CTMs e biomateriais têm sido investigados como uma substituição para técnicas de enxerto ósseo mais convencionais (Kang et al. 2012).

As principais vantagens da utilização das CTMs de origem adiposa são que estas células são fáceis de se obter, estão disponíveis em quantidades substanciais (Li et al. 2007, Schäffler & Büchle 2007, Kang et al. 2012) e podem ser colhidas sem risco de morbidade no local do doador, além disso, tais células crescem estavelmente in vitro e têm uma taxa de expansão elevada (Schäffler & Büchle 2007, Kang et al. 2012). De acordo com Kang et al. 2012, as CTMs de origem adiposa também demonstraram ter um potencial de proliferação maior do que os outros tipos de CTMs.

MATERIAL E MÉTODOS

1. AVALIAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Foram selecionados nove cães dentre machos e fêmeas, de 1 a 12 anos, das seguintes raças: Maltês, Cane Corso, Sharpei, Sem Raça Definida, Labrador e Pitbull, sem sobretudo serem avaliados em relação a esses aspectos, que apresentassem algum grau de claudicação e fossem diagnosticados com RLCC através de exame clínico específico do aparelho locomotor. Sendo estes, o teste de gaveta e de compressão tibial, além de radiografias em posicionamento específico para a TTA conforme Hoffmann et al. 2006. A análise clínica foi complementada a partir da realização de hemograma completo e bioquímica de alaninaaminotransferase (ALT) e creatinina, definidos como exames pré-operatórios, a fim de obter dados que comprovassem a higidez dos animais utilizados ao longo do experimento. Todos os proprietários assinaram termo de consentimento do projeto (Anexo A)

Os animais também foram classificados no pré e pós-operatórios de acordo com o grau de claudicação, sendo graduados de ZERO a V, onde ZERO - o animal caminha normalmente; I – leve claudicação; II - claudicação óbvia, suportando o peso; III – claudicação severa, suportando o peso; IV – claudicação intermitente, sem suportar o peso e V – claudicação contínua, sem suportar o peso (Fossum 2008).

2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS – PRÉ-OPERATÓRIO/PÓS-OPERATÓRIO

2.1 Procedimento de analgesia e anestesia.

No momento anterior a indução anestésica, todos os animais receberam previamente ceftriaxona intravenosa, na dose de 30mg/kg. Em seguida foram induzidos com propofol intravenoso, na dose de 4mg/kg e mantidos na anestesia inalatória com isoflurano através de vaporizador universal. Foram utilizadas lidocaína (5mg/kg) e morfina (0,1mg/kg) em dose única via epidural buscando anestesia e analgesia, respectivamente.

2.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a aplicação da técnica de TTA descrita por Hoffmann et al. 2006 para tanto foram utilizados implantes da marca Focus®.

Para realização da técnica de TTA é necessária uma osteotomia na tuberosidade tibial; que pode levar cerca de 16 semanas para se consolidar. No intuito de acelerar o processo

de reparação desta área de osteotomia foram empregadas células tronco mesenquimais (CTMs) oito dias após a operação. As CTMs foram aplicadas de forma percutânea no sítio de osteotomia.

Para preparo das CTMs seguiu-se o seguinte protocolo:

Imediatamente após a realização da TTA foi coletado de todos os animais um fragmento de tecido adiposo (cerca de 20g) oriundo do tecido subcutâneo da região parapatelar medial, o qual foi acondicionado em solução para meio de transporte (fosfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio, glicose, antioxidantes e soro halógeno). As amostras foram encaminhadas ao laboratório Biocell para crescimento e cultivo das células-tronco em caixa de isopor contendo gelo.

Após chegar ao laboratório, a gordura foi submetida a um tratamento enzimático para extração e expansão das células tronco mesenquimais seguindo protocolo descrito por Kang et al. (2012). A gordura foi lavada extensivamente com solução salina tamponada com fosfato (PBS), fragmentada e digerida com colagenase em um agitador com água a 37°C por 45 min a 1 hora. A colagenase foi neutralizada com DMEM e 10% de soro fetal bovino (FBS). Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada e o sobrenadante desprezado, sendo que a fração contendo células-tronco originadas de tecido adiposo foi ressuspensa em DMEM e filtrada através de uma malha de nylon para remover restos e incubada em garrafas de cultura por 48 horas a 37°C numa atmosfera umidificada a 5% de CO₂ em meio normal (DMEM, FBS a 10% e 1% de solução antibiótica/antimicótica). Após incubação, as garrafas com células foram lavadas extensivamente com PBS para remover glóbulos vermelhos não aderentes residuais.

As células adquiridas foram mantidas no meio de cultura a 37°C / 5% de CO₂ até o oitavo dia pós-operatório, quando então foram removidas das garrafas por meio de tripsinização e transferidas juntamente com meio de transporte para seringas hipodérmicas de 1,0 mL que foram enviadas ao cirurgião responsável para aplicação percutânea no *gap* formado pela osteotomia (Figura 12).



Figura 12 – Fotografia crânio-medial demonstrando aplicação percutânea de células-tronco no sítio de osteotomia utilizando seringa de 1ml e agulha hipodérmica 30X8, 8 dias após o procedimento cirúrgico.

No décimo quinto dia pós operatório, os animais foram avaliados quanto a: condição clínica da ferida cirúrgica, quanto ao grau de claudicação, quanto a efetividade da técnica de TTA em eliminar o movimento de cisalhamento no joelho operado e quanto ao nível de dor na área operada.

Radiografias médio-lateral foram realizadas para avaliar a evolução da reparação óssea na área de osteotomia e imediatamente após ao exame radiográfico foi realizada remoção da sutura e limpeza da ferida cirúrgica com PVPI-degermante e álcool 70%.

Após limpeza da ferida, o paciente foi submetido aplicação percutânea do conteúdo presente na seringa que foi enviada pelo laboratório. O conteúdo da seringa foi aplicado na parte central do *gap* ósseo. Em cinco animais foi aplicado apenas o meio de cultura sem a presença de células (**Grupo controle**) e em quatro animais foi aplicada a seringa contendo o meio de cultura com CTMs (**Grupo tratado**). Somente o laboratório tinha conhecimento de qual animal receberia meio de transporte com CTMs e qual receberia apenas o meio de transporte.

Desta forma, o estudo foi caracterizado como duplo cego, já que nem o cirurgião nem o proprietário do animal sabiam se o mesmo encontrara-se no grupo tratado (GT) ou grupo controle (GC).

2.3 Cuidados pós-operatórios

A medicação para controle da dor pós-operatória consistiu de dipirona 25mg/kg/VO a cada 12 horas durante cinco dias associada ao cloridrato de tramadol 3 mg/kg VO a cada oito horas durante três dias. Anti-inflamatório não esteroideal (meloxicam) 0,1 mg/kg VO a cada 24 horas foi administrado na manhã após a cirurgia e continuou durante dois dias.

2.4 Análise radiográfica.

Os animais foram radiografados aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias pós operatórios. Foi utilizado o sistema de radiografia Compacto Plus 500L, distância foco-filme 100 cm, nas projeções médio-lateral do joelho acometido (epífises proximal e distal e ainda diáfise), nas técnicas 40kv e 05mAs para animais até 10 kg, 42kv e 05mAs para animais de 10-20 kg e 44kv e 05mAs para animais a partir de 20 kg.. As radiografias foram avaliadas por dois veterinários que classificaram as imagens de acordo com a descrição de Hoffmann et al. 2006: zero - indica que não houve cicatrização óssea, I - representa uma produção óssea precoce sem fazer ponte entre a tuberosidade tibial e o eixo da tibia, II - significa formação óssea em um local, III - indica ponte óssea em dois locais, IV - representa ponte óssea em todos os três locais, sendo eles, a região de osteotomia proximal ao *cage*, a região de osteotomia entre o *cage* e a placa e a região distal da osteotomia à placa (Figura 13).

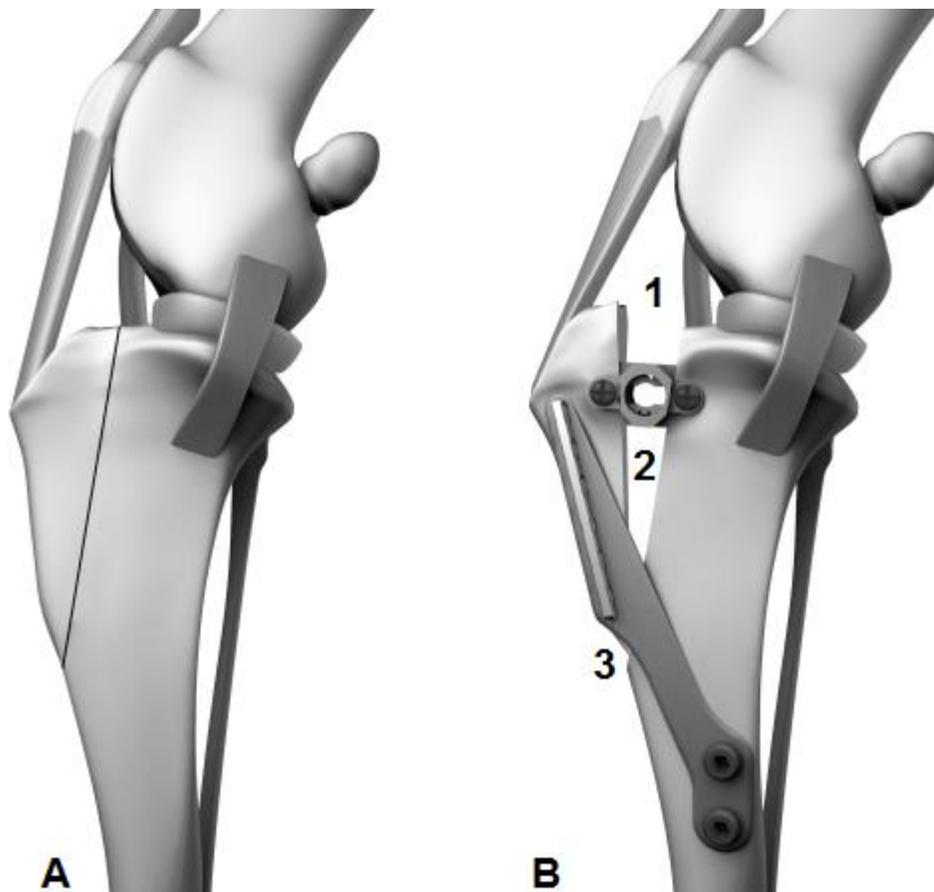


Figura 13 - Modelo esquemático demonstrando (A) Posição da osteotomia e (B) Ilustração pós-operatória da TTA indicando os locais de avaliação do preenchimento ósseo. Os sítios foram definidos como (1) a região de osteotomia proximal ao *cage*, (2) região de osteotomia entre o *cage* e a placa, e (3) a região de osteotomia distal à placa (Kim et al. 2010).

2.5 Diferenciação osteogênica

Para avaliar o potencial osteogênico das CTMs cultivadas, parte das células permaneceram no laboratório e foram induzidas à diferenciação celular para tecido ósseo .

Para a diferenciação osteogênica *in vitro* as CTMs purificadas foram mantidas em um meio de cultura contendo ácido ascórbico, dexametasona e fosfato de beta-glicerol segundo protocolo estabelecido por Kang et al. 2012. Após diferenciação celular, a detecção de matriz óssea foi realizada mediante coloração com corante von Kossa (figura 14) .

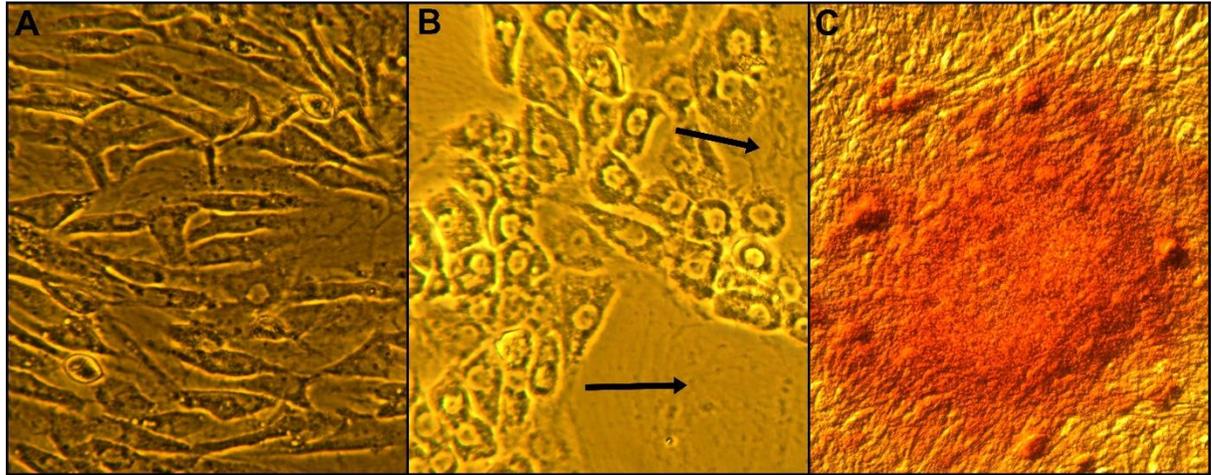


Figura 14 - Microscopia óptica (aumento 400X) demonstrando (A) as CTMs, (B) as células-tronco diferenciadas em osteócitos com presença da matriz extra-celular preenchida por cálcio (Setas pretas) e (C) osteócitos após coloração Von Kossa demonstrando preenchimento por cálcio.

2.6 Densidade das trabéculas ósseas dispostas na substância esponjosa

Para avaliação da densidade das trabéculas ósseas da substância esponjosa dos animais submetidos ao procedimento, processaram-se as imagens capturadas no programa Adobe Photoshop CS6 (versão 6.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA) de acordo com Mahl et al. 2009. Usando as projeções médio-lateral do joelho acometido (epífises proximal e distal e diáfise), foram realizados cortes que representassem a substância esponjosa da região do sítio de osteotomia existente após a realização do procedimento cirúrgico. As imagens analisadas dos grupos foram processadas no programa Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics Inc. Silver Springs, MD) de acordo com Blatt, et al. 2004, empregando a ferramenta “*Perform Segmentation*” (Figura 15).

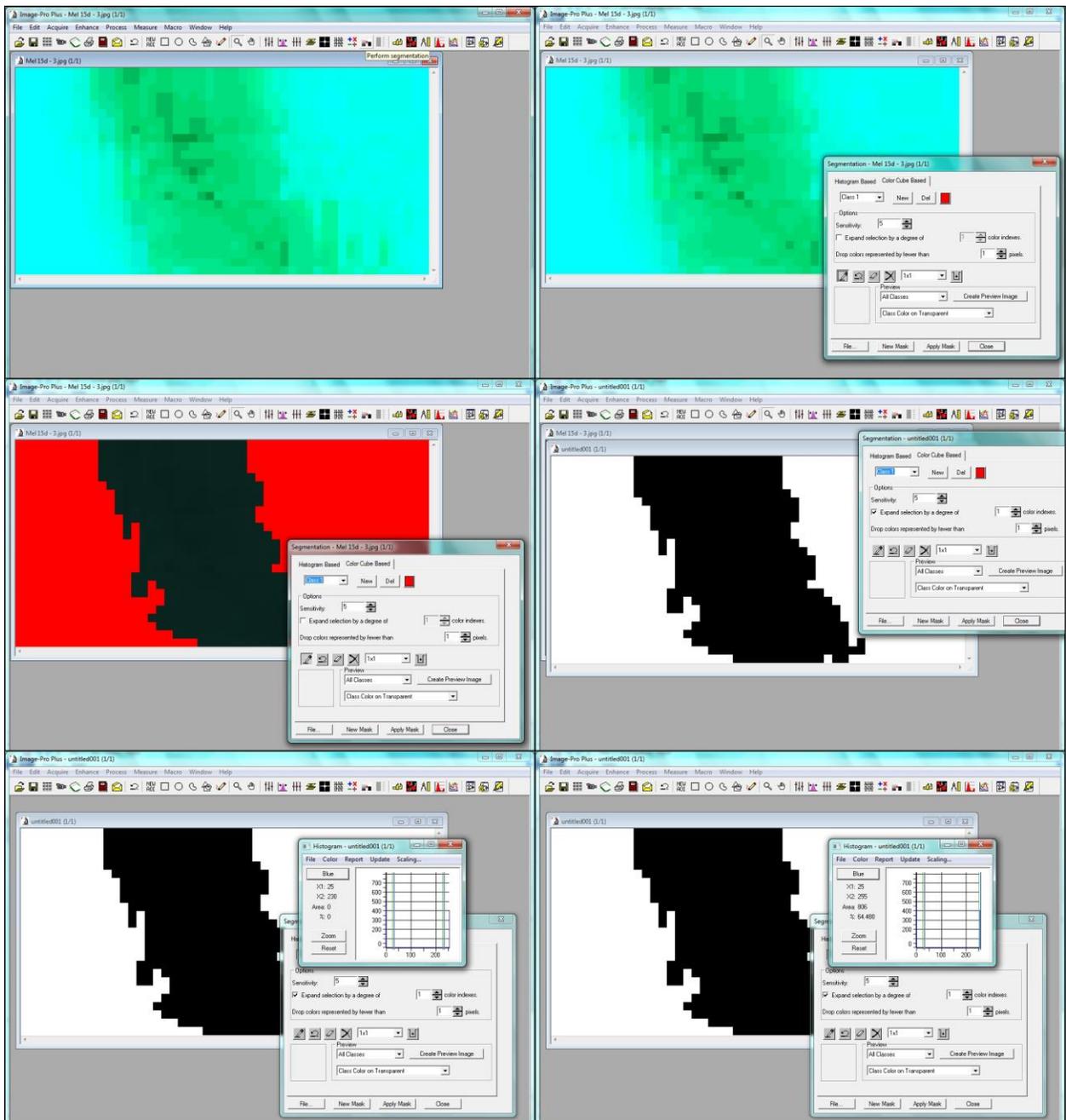


Figura 15 – Ilustração do uso do programa de análise de imagens Image-Pro Plus 6.0® para quantificação da densidade de osso trabecular. Para a avaliação, após a imagem estar aberta no programa (A), deve ser aberta a guia "perform segmentation" (seta vermelha). Com a nova guia aberta, com o auxílio do conta gotas (seta vermelha) (B), selecionar a área correspondente ao tecido ósseo (seta preta) para marcação e destaque da área em questão (C). Após a marcação, foi aplicado o efeito de máscara para contraste entre branco (área a ser avaliada) e preto (seta vermelha) (D). Em seguida, com auxílio da ferramenta de histograma do programa, arrastar a linha da direta do histograma (E) para o final do mesmo (setas vermelhas) (F), para que apenas a

área branca previamente marcada seja quantificada, apresentando o resultado em porcentagem (elipse vermelha).

2.7 Análise estatística

Foi efetuada análise descritiva para obtenção da média e desvio padrão. A normalidade foi obtida a partir da aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov. As radiografias foram divididas em grupos nos períodos de avaliação de pós-operatório, de modo que as imagens foram classificadas conforme o proposto por Hoffmann et al. 2006, em diferentes escores e em períodos distintos, a partir da aplicação do Teste Qui-quadrado. A densidade das trabéculas ósseas dispostas na substância esponjosa foi avaliada, em cada um dos períodos, para os dois grupos, a partir da aplicação do teste de Mann Whitney. Esta densidade foi ainda comparada entre os diferentes períodos a partir da aplicação do teste de múltipla comparação de Tukey's, entre os dois grupos. Foi adotado como sendo como $p \leq 0,05$ para todos os testes e para tal empregou-se o programa Graph Pad Prism 6.0.

RESULTADOS

1. AVALIAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Foram submetidos ao procedimento cirúrgico nove animais para aplicação da técnica de TTA, sendo três machos e seis fêmeas. A idade média desses animais foi de 6,1 anos variando de um a 12 anos. Três desses animais eram de raças mestiças (33,33%), dois da raça maltês (22,22%), um da raça labrador (11,11%) e os demais de outras raças (33,33%). O período médio entre o dia do diagnóstico e o procedimento cirúrgico foi de 19,1 dias. Os animais foram classificados no pré e pós-operatórios de acordo com o grau de claudicação (0-5) (Fossum 2008), conforme a tabela abaixo.

Tabela 1 – Classificação da claudicação (%) de acordo com Fossum 2008. Animais dos grupos controle (GC) e tratados com CTMs (GT) no período pré-operatório e com 8 dias de pós-operatório.

<i>SCORE</i>	II		III		IV		V	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
GT (n=4)	-	-	25	50	50	50	25	-
GC (n=5)	-	60	40	40	20	-	40	-

2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS – PRÉ-OPERATÓRIO E PÓS-OPERATÓRIO

2.1. Procedimento cirúrgico

Todos os animais tiveram ruptura completa e unilateral do LCC da articulação do joelho, sendo que três (33%) romperam o LCC do joelho direito e seis (67%), do joelho esquerdo. Cinco (55%) utilizaram *cage* 6 mm, três (33%) utilizaram *cage* 9 mm e apenas um (11%) o *cage* número 12 mm. As placas foram escolhidas de acordo com o padrão radiográfico com os animais devidamente posicionados (articulação fêmoro-tíbio-patelar com angulação de 135°) e foram utilizadas duas placas número 0, uma placa número 0,5, duas placas número 1, uma placa número 2, duas placas número 3 e uma placa número 4 (Figura - 16)

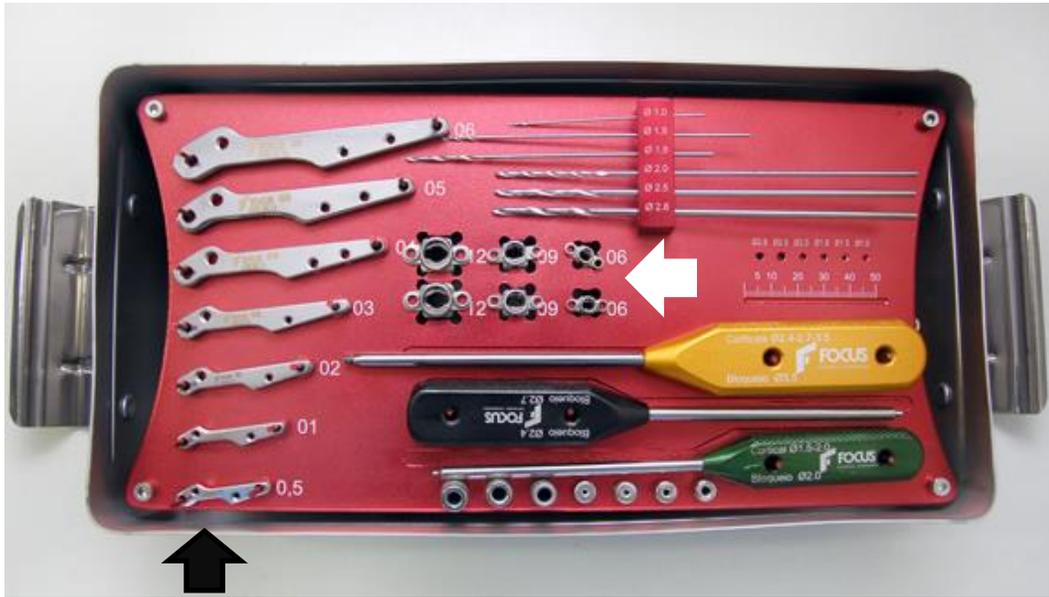


Figura 16 - Fotografia demonstrando a caixa do sistema de TTA com bloqueio da marca Focus® utilizado para a realização do experimento. A esquerda (seta preta) os diferentes tamanhos de placas que variam de 0,5 a 6 e na região central (seta branca) os tamanhos de *cages* disponíveis (06, 09 e 12).

2.2. Complicações pós-operatórias

Dentre os animais tratados (GT), foi observado um total de cinco complicações pós-operatórias, dentre elas seroma, vômito, tosse, infecção na região da ferida cirúrgica e 50% destes tiveram fratura da tuberosidade tibial após 15 dias da colocação do implante, mas sem necessidade de nova intervenção para correção da fratura. Em um dos animais, a infecção foi recorrente na região do *cage* e foi recomendada a retirada do implante após o total preenchimento do local da osteotomia. No GC foram observadas três (40%) complicações pós-operatórias, dentre elas fratura da tuberosidade tibial após 24 e 42 dias, infecção na região da ferida cirúrgica próximo ao *cage*, e um caso de discreto seroma na região da ferida cirúrgica do local onde foi retirada amostra do tecido adiposo.

Todos os animais receberam alta cirúrgica e clínica ao final do experimento, pois não apresentavam nenhum grau de dor à palpação dos membros submetidos aos procedimentos. Em um paciente foi observado claudicação grau I bilateral 120 dias após o procedimento, possivelmente devido à displasia coxofemoral bilateral concomitante, além disso, ele foi submetido a novo procedimento de TTA para correção da RLCC do joelho contralateral quando da finalização do experimento.

2.3. Análise radiográfica

As radiografias dos grupos foram divididas ao longo dos períodos de avaliação pós-operatória, de modo que as imagens foram classificadas conforme a tabela abaixo e os escores avaliados diante dos diferentes períodos de acordo com a aplicação do Teste Qui-quadrado (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação da ossificação (%) de acordo com Hoffman et al. 2006 dos animais dos grupos controle (GC) e tratados com células-tronco mesenquimal (GT) ao longo do período de avaliação. Teste Qui-quadrado com nível de significância $p \leq 0,05$, entre os mesmos períodos para os diferentes grupos.

SCORE	15 dias		30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		p
	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	
ZERO	50	75	20	50	10	-	-	-	-	-	<0,0001
I	30	12,5	10	12,5	10	12,5	-	-	10	12,5	0,07
II	-	12,5	40	25	50	25	30	-	20	-	<0,0001
III	20	-	20	12,5	-	50	30	62,5	30	50	<0,0001
IV	-	-	10	-	30	12,5	40	37,5	40	37,5	0,009



Figura 17 - Radiografias demonstrando os períodos avaliados e os escores dados de forma subjetiva. Imagens A, B, C, D e E representam animal do GT, respectivamente nos períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Imagens F, G, H, I e J representam animal do GC, respectivamente nos períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias. *Score II* (A), *Score III* (B, F e G), *Score IV* (C, D, E, H, I e J).

3. DENSIDADE DAS TRABÉCULAS ÓSSEAS DISPOSTAS NA SUBSTÂNCIA ESPONJOSA

Comparando separadamente a densidade das trabéculas ósseas da substância esponjosa da região recém-formada após a osteotomia nos diferentes grupos, foi possível constatar nos animais do GC uma média de preenchimento de 36,45% após 30 dias em relação ao GT, com diferença estatística conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Desvio padrão e erro padrão da média da densidade das trabéculas da substância esponjosa (%) nos grupos controle (GC) e tratado (GT). Foi aplicado o teste de Mann Whitney para entre os grupos em cada período. Asterisco na coluna, entre as diferentes linhas expressa diferença estatística $p \leq 0,05$.

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
GC	39,32 ± 6,42	71,50 ± 4,43*	70,99 ± 3,95	66,40 ± 5,51	66,67 ± 8,26
GT	48,81 ± 7,22	45,44 ± 7,34	64,50 ± 9,78	61,25 ± 4,49	68,45 ± 5,55

Asterisco (*) na coluna, entre as diferentes linhas expressa diferença estatística $p \leq 0,05$.

DISCUSSÃO

Comparativamente, os animais do GC obtiveram uma melhora efetiva no quadro da claudicação após oito dias do procedimento cirúrgico em relação ao GT, onde aqueles animais que foram classificados conforme o *score* de claudicação IV e V no GC demonstraram melhor recuperação. De forma relativa e parcial, apenas tomando como base a avaliação da claudicação, foi possível observar que os animais do GT obtiveram resposta semelhante aos animais do GC ao final do estudo. Sendo assim, foi possível extrapolar que a aplicação de células tronco mesenquimais não foi benéfica como se esperava, no que diz respeito à deambulação e diminuição do desconforto pós-operatório imediato para o grupo tratado. Este estudo não esteve de acordo com Holffmann et al. 2006 e Lafaver et al. 2007, quando nos animais avaliados houve uma resposta eficaz, mesmo que em curto prazo.

A utilização de propofol intravenoso e isoflurano inalatório para indução e manutenção da anestesia, respectivamente permitiram que os animais entrassem em plano anestésico e então fossem submetidos ao procedimento cirúrgico, não acarretando nenhuma intercorrência transcirúrgica. Conforme os achados, foi possível observar que a ocorrência de vômito pós-operatório poderia estar associada à ulceração gastrointestinal, decorrente da depressão, induzida por anti-inflamatório não esteroideal utilizado no pós-operatório, dos efeitos citoprotetores normais na mucosa gástrica incluindo supressão da secreção de bicarbonato e a produção de muco, conforme descrito por Monteiro-Steagall et al. 2013. Apesar da ocorrência do achado, deve ser enfatizado que a frequência foi pequena e esse achado não interfere nos resultados obtidos por esse estudo.

De outra forma, uma das complicações mais comuns descritas em todas as técnicas para correção da RLCC é a infecção no local de incisão, e nesse estudo, dentre os animais operados, 11% (um animal) apresentou essa complicação, concordando com os dados apresentados por Priddy et al. 2003 e Pacchiana et al. 2003 apud Hoffmann et al. 2006, nos quais estes índices variaram de < 1% a 7%; considerando que a ocorrência de observações mencionadas por estes autores foi de 193 casos (Priddy et al. 2003) e 397 (Pacchiana et al. 2003), a diferença percentual encontrada se dá devido ao pequeno número de animais avaliados. Para minimizar as taxas de complicações relacionadas à infecção, foi necessário: atenção aos detalhes do procedimento a ser realizado, cumprimento rigoroso das técnicas de assepsias pré-operatórias

e cuidados adequado no pós-operatório (Priddy et al. 2003). Estas recomendações, garantiram a diminuição das complicações como observado nos achados do experimento.

Ainda como fator complicador no pós-operatório, foi observada a formação de seromas em 20% no GC e 25% no GT. A evidenciação dos seromas estariam associados à utilização de eletrocautério conforme descrito por Porter et al. 1998, como foi adotado nos procedimentos. Normalmente seromas são indolores e sua ocorrência também pode atrasar as terapias adjuvantes no processo de cicatrização, além disso, tem sido associada à infecção das feridas (Porter et al. 1998).

Foram observados quatro casos de fratura da tuberosidade após a realização da cirurgia de TTA, sendo dois em cada um dos grupos. Como medida adotada para resolução deste complicador os animais acometidos foram tratados de forma conservadora. Esta escolha foi motivada pela pequena gravidade dos sinais clínicos, principalmente a intensidade da claudicação, e não pelos fatores decorrentes da fratura, tais como a conformação e deslocamento, estando de acordo com Calvo et al. 2014. Deve ser ressaltado que a estabilidade do parafuso no *cage* pode desempenhar um papel importante na estabilidade da tuberosidade tibial fraturada e, portanto, minimizar os sinais clínicos associados (Calvo et al. 2014). Em todos os casos, tratados de forma conservadora, o parafuso pareceu ser funcional e adequado, pois os animais apresentaram melhora clínica nas avaliações de claudicação e dor, mesmo não sendo submetidos a novo procedimento cirúrgico. Levando a crer que, a fratura da tuberosidade tibial é tida como uma complicação de TTA, que pode ter um prognóstico favorável embora possa resultar em morbidez significativa e, em alguns casos, uma nova cirurgia de revisão possa ser necessária. É uma complicação que pode ser evitável, através da atenção cuidadosa à técnica cirúrgica e tomada de decisão adequada em relação à escolha dos implantes e locais de aplicação.

Em ambas avaliações, objetiva e subjetiva, ao final do experimento foi possível observar que o GC obteve resultados iguais ao GT no que se refere ao processo de ossificação, contudo, o GT possivelmente obteve um atraso no período de diferenciação, justificável devido à necessidade de reorganização decorrente do processo inflamatório após a introdução das células tronco com oito dias de pós-operatório, ao contrário do estudo realizado por Zamprogn 2007 que verificou eficácia na terapia com células-tronco introduzidas após 15 dias da primeira intervenção no foco de fratura, promovendo a união óssea ao final do estudo. Dessa forma,

tomando como base o momento de aplicação das células, foi possível entender que este ocorreu em fase precoce, visto que o processo de diferenciação deveria ser iniciado a partir dele, mas contraditoriamente a isso, possivelmente as células foram em parte desviadas para a reorganização do processo inflamatório instalado após a sua introdução no meio. Levando em consideração que a primeira fase denominada inflamatória ocorre desde o primeiro dia de lesão até o terceiro dia (Cho et al. 2002), e que nesse momento se dá a limpeza das áreas danificadas e migração de células pluripotentes, estas são ativadas para desempenhar funções imunossupressoras e redução da resposta das células imunes (El-Jawhari et al. 2016), justificando, portanto, a resposta evidenciada. De outra forma, somente na segunda fase, denominada de reparo ou condrogênica, caracterizada pelo pico de expressão de colágeno a partir do sétimo dia até o décimo quarto (Cho et al. 2002), foi quando se observou diferenciação das células pluripotentes em osteoblastos ou condroblastos e angiogênese induzida por macrófagos, que também regularam a diferenciação das células pluripotentes e assim a ação de outras células imunológicas, linfócitos T e B, localizados em contato próximo aos osteoblastos, auxiliando então a transição da cartilagem para o osso (El-Jawhari et al. 2016).

Sabe-se que a fratura óssea, é uma interrupção do fornecimento de sangue e posterior agregação plaquetária com a liberação de citocinas pró-inflamatórias derivadas das plaquetas (El-Jawhari et al. 2016). Estas citocinas estimulam o retorno de linfócitos e monócitos/macrófagos para o local da fratura, iniciando o processo de cicatrização óssea (El-Jawhari et al. 2016). A terceira e última fase denominada osteogênica ou de remodelamento se inicia nas primeiras 24 horas e a diferenciação máxima ocorre entre os dias 14 e 21 após a fratura (Cho et al. 2002). Sendo assim, nos dois casos do GT que tiveram fratura aos 15 dias, tal fratura pode ter influenciado o atraso observado da cicatrização em relação aos animais do GC que apresentaram a fratura tardiamente, sugerindo que as células troncos introduzidas podem não ter se diferenciado em osteoblastos como esperado, e sim mais uma vez desviadas para o novo processo inflamatório instalado após a fratura da tuberosidade tibial. Acrescido ao fato que a escolha do tempo de intervenção terapêutica em relação ao estado inflamatório é um desafio essencial a ser abordado conforme observação de El-Jawhari et al. 2016. De qualquer modo, ambos os grupos alcançaram a ossificação completa dentro do período de 8 a 10 semanas de pós-operatório conforme proposto por Hoffmann et al. 2006.

CONCLUSÕES

O tratamento da RLCC pela técnica de TTA promove a formação de um *GAP* de fratura que pode levar até 10 semanas para se consolidar. Devido ao amplo emprego da TTA em cães, tornou-se relevante o estudo visando uma antecipação do processo reparativo do *GAP* de osteotomia.

O uso terapêutico de células tronco mesenquimais para recuperação da perda óssea deve considerar o microambiente, particularmente o estado de inflamação. Dessa forma, para o período avaliado, não foi possível minimizar o tempo estimado de recuperação do *GAP*, sugerindo inicialmente um aumento no número de animais avaliados e uma reavaliação em relação ao tempo de intervenção terapêutica com as células tronco. Além disso, acredita-se que a quantidade de células inseridas possa ser proporcional ao tamanho dos animais sugerindo também padronização do tamanho dos pacientes e/ou da quantidade de células introduzidas. Contudo, é possível que o uso de imagens digitais possam evitar a ocorrência de subjetividade das avaliações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLATT R.J.; CLARK A.N.; COURTNEY J.; TULLY C.; TUCKER A.L.. Automated quantitative analysis of angiogenesis in the rat model using Image-Pro Plus 4.1. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 75, p. 75-79, 2004.
- BOUDRIEAU R.J.. Tibial plateau leveling osteotomy or tibial tuberosity advancement. **Veterinary Surgery**, v. 38, p. 1-22, 2009.
- CADMUS J.; PALMER R.H.; DUNCAN C.. The effect of preoperative planning method on recommended tibial tuberosity advancement cage size. **Veterinary Surgery**, v. 9999, p. 1-6, 2014.
- CALVO I.; ALSA J.; CHASE D.; GARCIA-FERNANDEZ P.; SAN ROMAN F.; BENNETT D.. Tibial tuberosity fracture as a complication of tibial tuberosity advancement. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 27, p. 148-154, 2014.
- CHO T.; GERSTENFELD L.C.; EINHORN T.A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing. **Journal of bone and mineral research**, v. 17, n. 3, p. 513-520, 2002.
- COMERFORD E.J.; SMITH K.; HAYASHI K.. Update on the aetiopathogenesis of canine cranial cruciate ligament disease. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 24, p. 91-98, 2011.
- COOK J.L.. Cranial cruciate ligament disease in dogs: biology versus biomechanics. **Veterinary Surgery**, v. 39, p. 270-277, 2010.
- DUERR F.M.; MARTIN K.W.; RISHNIW M.; PALMER R.H.; SELMIL. E.C.. Treatment of canine cranial cruciate ligament disease. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 27, p. 478-483, 2014.
- DUNN A.L.; BUFFA E.A.; MARCHEVSKY A.M.; HELLER J.; MOORES A.P.; FARRELL M.. Inter- and intra-operator variability associated with extracapsular suture tensioning. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 25, p. 472-477, 2012.
- EL-JAWHARI J. J.; JONES E.; GIANNOUDIS P.V. The roles of immune cells in bone healing; what we know, do not know and future perspectives. **International Journal of the Care of the Injured**, v. 47, p. 2399-2406, 2016
- FORTIER L.A.. (INVITED REVIEW) Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 415-423, 2005.
- FOSSUM T.W.. **Cirurgia de pequenos animais**. 3^a ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2008, 1606p
- GRIFFON, D.J.. A Review of the pathogenesis of canine cranial cruciate ligament disease as a basis for future preventive strategies. **Veterinary Surgery**, v. 39, p. 399-409, 2010.
- GUÉNÉGO L.; ZAHRA A.; MADELÉNAT A.; GAUTIER R.; MARCELLIN-LITTLE D.J.; HULSE D.. Cranial cruciate ligament rupture in large and giant dogs - A retrospective evaluation of a modified lateral extracapsular stabilization. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 20, p. 43-50, 2007.
- HARPER T.A.M.; MARTIN R.A.; WARD D.L.; GRANT J.W.. An in vitro study to determine the effectiveness of a patellar ligament/fascia lata graft and new tibial suture anchor points for extracapsular stabilization of the cranial cruciate ligament-deficient stifle in the dog. **Veterinary Surgery**, v. 33, p. 531-541, 2004.
- HOFFMANN D.E.; MILLER J.M.; OBER C.P.; LANZ O.I.; MARTIN R.A.; SHIRES P.K.. Tibial tuberosity advancement in 65 canine stifles. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 19, p. 219-227, 2006.

- HORWITZ, E.M.; PROCKOP, D.J.; FITZPATRICK, L.A.; KOO, W.W.K; GORDON, P.L.; NEEL, M.; SUSSMAN, M.; ORCHARD, P.; MARX, J.C.; PYERITZ, R.E.; BRENNER, M.K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, v. 5, p. 309–313, 1999.
- KANG B.; RYU H.; PARK S.S.; KOYAMA Y.; KIKUCHI M.; WOO H.; KIM W.H.; KWEON O.. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, p. 299-310, 2012.
- KIM S.E.; POZZI A.; BANKS S.A.; CONRAD B.P.; LEWIS D.D.. Effect of cranial cruciate ligament deficiency, tibial plateau leveling osteotomy, and tibial tuberosity advancement on contact mechanics and alignment of the stifle in flexion. **Veterinary Surgery**, v. 39, p. 363-370, 2010.
- KRAUS K.H.; KIRKER-HEAD C.. (Invited review) Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, v. 35, p. 232–242, 2006.
- LAFAYER S.; MILLER N.A.; STUBBS W.P.; TAYLOR R.A.; BOUDRIEAU R.J.. Tibial tuberosity advancement for stabilization of the canine cranial cruciate ligament-deficient stifle joint: surgical technique, early results, and complications in 101 dogs. **Veterinary Surgery**, v. 36, p. 573–586, 2007.
- LI H.; DAI K.; TANG T.; ZHANG X.; YAN M.; LOU J. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, p. 836–842, 2007.
- LOPEZ M.J.; DAIGLE P.R.. Adult multipotent stromal cell technology for bone regeneration: A Review. **Veterinary Surgery**, v. 42, p. 1–11, 2013.
- MAHL C.R.W.; FOUNTOURA F.G.; BORELLI P.V.; SILVA I.L.; FONTANELLA V.. Mandible's radiographic and histomorphometric assessment in female rats medicated with glucocorticoid and biphosphonate. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 50, p. 16-19, 2009.
- MARINO D.J.; LOUGHIN C.A.. Diagnostic imaging of the canine stifle: A review. **Veterinary Surgery**, v. 39, p. 284-295, 2010.
- MONTEIRO B.S.; ARGÔLO-NETO N.M.; NARDI N.B.; CHAGASTELLES P.C.; CARVALHO P.H.; BONFÁ L.P.; FILGUEIRAS R.R.; REIS A.S.; DEL CARLO R.J. Treatment of critical defects produced in calvaria of mice with mesenchymal stem cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 3, p. 841-851, 2012.
- MONTEIRO-STEAGALL B.P.; STEAGALL P.V.M.; LASCELLES B.D.X.. Systematic review of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced adverse effects in dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 1011–1019, 2013.
- MUIR P.. **Advances in the canine cranial crucial ligament**. 1^aed. Wiley-Blackwell: Iwoa, 2010, 320p.
- NWADIKE B.S.; ROE S.C.. Mechanical comparison of suture material and knot type used for fabello-tibial sutures. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 11, p. 52-57, 1998.
- PORTER K.A.; O'CONNOR S.; RIMM E.; LOPEZ M; Electrocautery as a factor in seroma formation following mastectomy. **The American Journal of Surgery**, v. 176, p. 8-11, 1998.
- SCHÄFFLER A.; BÜCHLER C.. (Concise review) Adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem cells**, v. 25, p. 818-827, 2007.

- SELL S.. **Stem cells handbook**. 3^a ed. Humana Press: New Jersey, 2004, 509p.
- VEDRINE B.; GUILLEMO A.; FONTAINE D.; RAGETLY G.R.; ETCHEPAREBORDE S.. Comparative anatomy of the proximal tibia in healthy labrador retrievers and yorkshire terriers. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 26, p. 266-270, 2013.
- VENZIN C.; HOWARD J.; RYTZ U.; SPRENG D.; SCHAWALDER P.; DOHERR M.; SCHMÄKEL H.. Tibial Plateau angles with and without cranial cruciate ligament rupture. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 17, p. 232-236, 2004.
- ZAMPROGNO, Helia Christine Dórea de Macedo. **Uso de células osteoprogenitoras da medula óssea para o tratamento de lesões ósseas em caes (*Canis familiaris*)**. Rio de Janeiro: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008. 99p. Dissertação (Doutorado em Ciências Morfológicas) - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

ANEXOS

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO

Autorização para Coleta de Tecido Adiposo e Aplicação de Células-tronco

TERMO DE RESPONSABILIDADE MÉDICO-VETERINÁRIA

Para fins de ordem legal, autorizo a prática dos procedimentos veterinários para coleta de tecido adiposo e posterior aplicação de células tronco no animal de minha propriedade.

Declaro ainda estar perfeitamente ciente de todos os aspectos que envolvem os procedimentos de coleta de tecido adiposo e aplicação das células tronco, tendo recebido do médico veterinário todas as informações solicitadas, bem como outras subsidiárias, conforme a seguir explicita:

- Que lhe foram detalhadamente explicadas por seu médico a natureza, a finalidade, as peculiaridades, os benefícios, os riscos e as possíveis complicações dos procedimentos;
- Que, como em toda intervenção cirúrgica, existe um risco excepcional de mortalidade, decorrente do próprio ato cirúrgico ou das condições vitais do paciente;
- Que foi informado(a) e está ciente de que, como em qualquer outro ato operatório, ao submeter-se à presente cirurgia está também sujeita a sofrer complicações e idiosincrasias, intra-operatórias e pós-operatórias, tais como: reações aos medicamentos administrados, hemorragias, infecções, parada cardio-respiratória, dentre outras;
- Que foi também esclarecido(a) acerca de outras intercorrências e seqüelas que podem advir da cirurgia proposta, tais como acúmulo de líquidos, sangue ou secreções nas cavidades operatórias ou na pele; aparecimento de manchas hipo ou hipercrômicas e inchaço na região operada; necrose da pele por redução da irrigação sangüínea; cicatrizes queiloideanas;
- Que cada uma dessas complicações e o significado de seu nome técnico lhe foi detalhadamente explicada pelo médico veterinário; Que essas complicações, algumas vezes, decorrem de fatores imponderáveis e imprevisíveis, tais como reações orgânicas do próprio paciente; 7) Que em virtude do acima exposto poderá ser imperativa a utilização de monitorização invasiva, sobre a qual já foi o proprietário do paciente suficientemente esclarecido (a);
- Que se ocorrerem intercorrências ou imprevistos a equipe médica veterinária poderá adotar técnica cirúrgica diferente da programada, sempre em benefício do paciente;
- Que, na eventualidade acima descrita, o tempo de hospitalização poderá estender-se além do programado;

• Que deverá informar ao médico veterinário todos os medicamentos e drogas que esteja utilizando pelo animal, posto que tais substâncias podem produzir interações deletérias com os anestésicos ou trazer complicações operatórias e pós-operatórias;

• Que com tais explicações e esclarecimentos está plenamente satisfeito(a), tendo compreendido e aceitado se submeter ao tratamento de terapia celular proposto;

Outrossim, declaro as especificações do animal de minha propriedade, dato e assino o presente documento, com força de contrato de prestação de serviços médico-veterinários.

Espécie : _____

Raça : _____

Sexo : _____

Pelagem: _____

Nome : _____

Idade : _____

Proprietário: _____

Endereço : _____

R.G. : _____

CPF : _____

Telefones: _____

E para que fique registrado o seu pleno consentimento em se submeter ao procedimento de coleta de tecido adiposo e aplicação de células tronco acima descrito, firma o presente documento em 03 (três) vias de igual teor e forma, as quais vão também assinadas pelo proprietário do animal e por mais 02 (duas) testemunhas.

_____, ____ de _____ de _____

Proprietário do Animal

Médico Veterinário Responsável

Testemunhas

Responsabilidade Clínica do Médico Veterinário

Eu, Dr. _____ registrado no Conselho Regional de Medicina Veterinária, sob o número _____, sou o responsável pelo tratamento _____ e acompanhamento _____ do animal _____, raça _____, de propriedade de _____ CPF _____, para quem estou indicando o tratamento de terapia celular para tratamento da lesão _____ com diagnóstico de _____.

Informe ao proprietário do paciente que a forma de ação das células tronco e que a terapia celular não causa risco para o animal entretanto os resultados esperados variam de acordo com cada animal bem como com a extensão da lesão. Portanto, o acompanhamento dos resultados, bem como a terapia pós aplicação deve ser acompanhado pelo médico veterinário responsável pela terapia celular.

A Ser preenchido pelo proprietário do paciente

Eu, _____, Carteira de identidade número _____ Órgão Expedidor _____, residente na rua _____, Cidade _____, Estado _____, e telefone para contato _____, recebi pessoalmente as informações sobre o terapia celular que será aplicada em meu animal e declaro que entendi as orientações prestadas.

Assinatura _____

R.G. do Responsável _____

Data e Assinatura do Médico _____ CRMV _____