

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

**CORREÇÃO DE RUPTURA DE LIGAMENTO
CRUZADO EM CÃES COM IMPLANTE DE
POLIPROPILENO ASSOCIADO À FRAÇÃO TOTAL
DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

TESE DE DOUTORADO

Daniel Curvello de Mendonça Müller

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**CORREÇÃO DE RUPTURA DE LIGAMENTO
CRUZADO EM CÃES COM IMPLANTE DE
POLIPROPILENO ASSOCIADO À FRAÇÃO TOTAL
DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

por

Daniel Curvello de Mendonça Müller

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

Orientador: Prof. Ney Luis Pippi

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

© 2010

Todos os direitos autorais reservados a Daniel Curvello de Mendonça Müller. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor. Endereço: Rua Reinaldo Manoel Guidolin, 257, AP 302. Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97110-220. Fone (0xx)55 91490320; Fax (0xx) 32208167; End. Eletr: cmdaniel@terra.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Clínica de Pequenos Animais**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**CORREÇÃO DE RUPTURA DE LIGAMENTO CRUZADO EM
CÃES COM IMPLANTE DE POLIPROPILENO ASSOCIADO À
FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

elaborada por
Daniel Curvello de Mendonça Müller

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Cirurgia Veterinária

Comissão Examinadora

Ney Luis Pippi, Dr., UFSM
(Presidente/Orientador)

João Eduardo Wallau Schossler, Dr., UFSM

Dominguita Luheres Graça, Dra., UFSM

Eduardo Santiago Ventura de Aguiar, Dr., UPF

Marcelo Meller Alievi, Dr., UFRGS

Santa Maria, 09 de abril 2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Aos meus pais, pelo suporte constante e incondicional.

À minha esposa Paula, pelo amor, compreensão e completo apoio e companheirismo durante a realização desse trabalho.

À equipe: Arícia, Gabriele, Maurício, João Paulo, Eduardo, Luciele e Wagner, pela amizade e competência.

Ao meu orientador Ney Luis Pippi, pela disponibilidade e incentivo constantes, sendo sempre um facilitador na realização das atividades da pesquisa.

A prof^a. Dominguita Lühers Graça, pela amizade e disponibilidade na interpretação dos resultados obtidos.

À Tatiana Mello de Souza e Rafael Figueira, pelo constante auxílio ao longo do trabalho.

Ao prof. João Eduardo Schossler, por todo o ensinamento, amizade e incentivo à linha de pesquisa.

“Aos animais, vítimas solicitadas pela ciência, que com os olhos tristes nos falam de sua vontade de viver, meu eterno respeito e gratidão”

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CORREÇÃO DE RUPTURA DE LIGAMENTO CRUZADO EM CÃES COM IMPLANTE DE POLIPROPILENO ASSOCIADO A FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES

AUTOR: DANIEL CURVELLO DE MENDONÇA MÜLLER

ORIENTADOR: NEY LUIS PIPPI

Santa Maria, 09 de abril de 2010

A ruptura do ligamento cruzado (LC) é uma lesão diagnosticada em grande parte dos cães com problemas articulares, sendo a causa mais comum de afecção articular degenerativa da articulação do joelho. Este trabalho teve por objetivo, avaliar a ação da fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea (FCMO) de aplicação intra-articular, após a correção cirúrgica dos ligamentos cruzados rompidos. Foi proposta uma nova técnica de correção cirúrgica desta afecção, avaliando-se clinicamente a ação da malha de polipropileno como único substituto do ligamento cruzado cranial e caudal de cães. Foram utilizados 20 cães, submetidos à desmotomia unilateral dos LC cranial e caudal. Vinte e um dias após a ruptura, todos foram tratados cirurgicamente pela técnica de redução aberta, com o implante de polipropileno, substituindo apenas o ligamento cruzado cranial (LCC). Dez animais receberam a FCMO no momento da correção. As avaliações se deram por estudo radiográfico, exames clínicos e biópsias aos 50 e 90 dias pós-operatórios. A técnica cirúrgica proposta demonstrou ser de rápida execução e pouca dissecação de tecidos moles, retorno precoce à deambulação e resistência adequada do implante. O grupo que recebeu a FCMO apresentou crescimento ósseo intra-articular ao estudo radiológico, contudo, os vinte animais apresentaram células CD34 positivas em suas amostras biopsiadas, indicando haver presença de células-tronco em ambos os grupos. Concluiu-se que não houve diferença clínica entre os dois grupos até os 90 dias de avaliação.

Palavras-chave: Desmotomia do ligamento cruzado, implante sintético, células-tronco.

ABSTRACT

Doctorate Thesis
Veterinarian Physician Post-Graduation Program
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

CORRECTION OF LIGAMENT RUPTURE IN DOGS WITH POLYPROPYLENE IMPLANTS LINKED TO TOTAL FRACTION OF MONONUCLEAR CELLS

AUTHOR: DANIEL CURVELLO DE MENDONÇA MÜLLER

ADVISER: NEY LUIS PIPPI

Santa Maria, april, 09th, 2010

The ligament rupture (LC) is lesion diagnosed in most dogs with joint problems, and the most common cause is degenerative joint disease of the knee joint. This study aimed to evaluate the action of the total fraction of mononuclear cells from autologous bone marrow (FCMO) applied intra-articular by after surgical repair of ruptured cruciate ligament. It is proposed a new technique for surgical correction of this disease, evaluating clinically the action of a polypropylene mesh as the only substitute for cranial cruciate ligament and flow of dogs. Twenty dogs underwent unilateral desmotomy cranial and caudal LC. Twenty-one days after the break, all were treated surgically by the technique of open reduction, with implantation of polypropylene replacing only the cranial cruciate ligament (CCL). Ten animals received FCMO at the time of correction. The assessments were by X-ray study, clinical examinations and biopsies at 50 and 90 days postoperatively. The surgical technique has shown rapid implementation and low soft tissue dissection, early return to ambulation and adequate strength of the implant. The group that received FCMO grew intra-articular bone at the X-ray study, however, the twenty animals showed CD34 positive in their biopsy samples, indicating a presence of stem cells in both groups. It was concluded that there was no clinical difference between the two groups until 90 days of evaluation.

Key-word: Desmotomia cruciate ligament, synthetic implants, stem cells.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO

- FIGURA 1 - Imagens representativas dos ligamentos cruzados cranial (LCC) e caudal (LCA) na visão cranial (direita) e lateral (esquerda)..... 30
- FIGURA 2 – Imagens representativas do LCC rompido. Percebe-se a projeção cranial da tíbia em relação ao fêmur quando há ruptura do LCC..... 30
- FIGURA 3 – Técnica extra-articular utilizando sutura de grosso calibre para diminuir a instabilidade articular. Os pontos de ancoragem do fio: sutura atrás da fabela (no fêmur) e orifício criado na crista da tíbia (seta) 31
- FIGURA 4 – Sequência da técnica intra-articular de substituição do ligamento cruzado cranial, com retalho unipediculado de fásia lata. Em (A), observa-se a delimitação da fásia lata. (B) Retalho unipediculado de fásia lata isolado da musculatura. (C) Imagem do novo ligamento emergindo do orifício confeccionado no fêmur. (D) Resultado final da sutura cutânea após correção intra-articular do ligamento cruzado cranial com retalho unipediculado de fásia lata..... 31

CAPITULO 1

- FIGURA 1 - Confeções do implante - (A) Padronização da largura de 2,3cm da malha de polipropileno, antes da dobragem. (B) Dobragem das extremidades voltando-as para o ponto central da malha. (C) Dobragem da malha ao meio, resultando em um implante de aproximadamente 0,5cm, considerando que se perde 0,1cm de largura em cada uma das 3 dobras. (D) Fixação da malha através de sutura contínua com fio de polipropileno, ao centro do implante..... 48
- FIGURA 2 – Sequência cirúrgica – (A) Incisão lateral ao longo do fêmur e exposição da articulação. (B) Confeção do túnel ósseo na tíbia e confeção do túnel ósseo no fêmur. (C) Trajeto do implante de LCC por dentro dos túneis ósseos. (D) Fixação do implante no fêmur (fixação dupla) e na tíbia (hemicerclagem)..... 49
- FIGURA 3 – (A) Imagem do fio de aço fechado sobre o implante. (B) Sutura no implante, formando uma alça envolvendo o nó da cerclagem. (C) Implante fixado ao fêmur emergindo na porção central da articulação. (D) Imagem do implante aos 90 dias após a sua colocação. Observa-se o crescimento tecidual ao longo do implante e a sua integridade..... 50

FIGURA 4 – Imagem antero-posterior (A) e latero-lateral (B) da articulação saudável. Repara-se que em B, o fêmur e a tíbia estão alinhados em suas porções caudais. Imagem antero-posterior (C) e latero-lateral, demonstrando projeção cranial da tíbia em relação ao fêmur (D) da articulação 21 dias após a desmotomia dos LCC e LCA. Imagem antero-posterior (E) e latero-lateral (F) dos fios de cerclagem utilizados para a fixação do implante ao fêmur e à tíbia. (G) Detalhe da fixação da cerclagem ao fêmur; (H) Detalhe de fixação da cerclagem à tíbia..... 51

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Obtenção de medula óssea com agulha de Steis em felino. (A) Imagem radiográfica ventro-dorsal da agulha introduzida no corpo do íleo; (B) Imagem da ventro-dorsal da agulha no trocanter maior do fêmur; (C) Imagem radiográfica antero-posterior da agulha de Steis introduzida no tubérculo maior do úmero; (D) Imagem lateral da região epifisária proximal da tíbia..... 69

FIGURA 2 – Punção da fossa trocântérica de cão com agulhas Steis. (A) Imagem radiográfica ventro-dorsal; (B, C) Detalhes do local de introdução da agulha no osso. Observa-se que a extremidade da agulha é apoiada contra a face interna do trocanter maior do fêmur..... 70

FIGURA 3 - Obtenção de medula óssea com agulha de Steis em canino. Imagem radiográfica latero-lateral (A) e frontal (B) da agulha na região epifisária proximal da tíbia; (C) Detalhe do local de introdução da agulha na tíbia demonstrado em peça anatômica; (D) Imagem radiográfica ventro-dorsal da região pélvica com a agulha introduzida no corpo do íleo; (E, F) Demonstração em peça anatômica dos locais de introdução da agulha do corpo do íleo; (G) Imagem radiográfica antero-posterior do úmero, com a agulha introduzida no tubérculo maior do úmero. (H, I) Detalhes da agulha em peça anatômica..... 71

FIGURA 4 – Imagens radiográficas de complicações durante a coleta de medula óssea. (A) Imagem antero-posterior da pelve, com a agulha de Steis transpassando o corpo do íleo e penetrando o interior da pelve. (B) Detalhe na peça anatômica, demonstrando a extremidade da agulha dentro da pelve e simulando as situações onde se transpassam as duas corticais do corpo do íleo. (C) Imagem antero-posterior, demonstrando a agulha introduzida no trocanter maior do fêmur e emergindo na região medial da coxa. (D) Imagem da agulha transpassando o tubérculo maior do úmero. (E) Imagem radiográfica da agulha transpassando a cortical oposta da região proximal da tíbia..... 72

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – Imagem radiográfica do membro posterior direito de um cão do grupo tratado. Em (A), observa-se a incidência crânio-caudal da articulação do joelho, após desmotomia do ligamento cruzado cranial e caudal, e em (B), a imagem da incidência latero-lateral no mesmo momento. As imagens (C) e (D), referem-se às mesmas incidências anteriores, porém, após 90 dias da correção cirúrgica com a técnica proposta. A seta branca da figura (D) demonstra o crescimento radiopaco ocorrido a partir do orifício da tíbia, sobre o trajeto do implante sintético..... 89

DISCUSSÃO

FIGURA 1 - Coloração de H&E do tecido ao redor do implante sintético de polipropileno. Este tecido conjuntivo mostra-se denso e maduro, apresentando-se intimamente entrelaçado à trama do implante. Observam-se espaços vazios entre o tecido. Trata-se do local onde estava o implante.....100

FIGURA 2 - Coloração de Tricromico de Masson do tecido ao redor do implante sintético de polipropileno. Observa-se presença de fibras colágenas azuis em ligeira predominância sobre as vermelhas.....101

FIGURA 3 - Coloração de Von Kossa do tecido ao redor do implante sintético de polipropileno. Observa-se a placa de cálcio corada em preto, demonstrando o crescimento ósseo sobre o implante sintético.....102

FIGURA 4 – Observa-se a marcação dos antígenos de superfície CD34, com o objetivo de identificar as células-tronco hematopoiéticas. O conjunto de células amarronzadas situadas no centro da imagem são as células marcadas pela imunohistoquímica.....103

FIGURA 5 – Lâmina demonstrando osso com presença de medula óssea funcional sobre o implante sintético de polipropileno.....104

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
SUMÁRIO.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
Ocorrência.....	14
Diagnóstico.....	15
Tratamento.....	20
Terapia celular.....	26
3. CAPÍTULO 1.....	32
4. CAPÍTULO 2.....	52
5. CAPÍTULO 3.....	73
6. DISCUSSÃO.....	90
7. CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS.....	106

1. INTRODUÇÃO

A ruptura do ligamento cruzado é uma desordem ortopédica comum em cães. Ela promove a instabilidade da articulação do joelho, resultando em claudicação e alterações degenerativas progressivas. O seu diagnóstico é baseado em achados clínicos, mas pode ser associado aos exames específicos para verificação da extensão da lesão e das alterações concomitantes. A melhor técnica para reparação desta enfermidade ainda não está bem elucidada. A maioria delas alcança uma taxa de sucesso entre 80 a 90% e todas apresentam vantagens e desvantagens. Uma associação entre perícia do cirurgião, classificação da alteração, temperamento do animal e colaboração do proprietário, devem ser considerados na escolha do melhor tratamento.

Uma das complicações associadas à utilização de enxertos nas técnicas intra-articulares ocorre na fase de remodelamento, na qual o enxerto pode deformar ou afrouxar caso o pós-operatório não seja satisfatório (GAGLIARDO et al., 2004). Na busca de evitar esta complicação, está indicada a imobilização do membro operado com muleta de Thomas (PENHA et al., 2007), ataduras de Robert Jones (PIERMATTEI & FLO, 1999), transfixação percutânea (Ehmer-Kirschner) (SALBEGO et al., 2007) ou olecranização da patela (SILVA & MUNIZ, 1994).

Acredita-se não haver técnica cirúrgica que estacione o desenvolvimento da afecção articular degenerativa (PIERMATTEI & FLO, 1999). O que se espera é que ocorra menor acometimento desta, após a estabilização cirúrgica do joelho (PIERMATTEI & FLO, 1999). Baseado nesta informação optou-se por associar a terapia celular ao tratamento cirúrgico. O princípio da terapia celular consiste em restaurar a função de um órgão ou tecido com a substituição das células perdidas por uma doença ou substituir células que não funcionam adequadamente, graças a um defeito genético, vascular ou iatrogênico (OLIVEIRA, 2008). As células-tronco constituem a fonte mais promissora da

terapia celular para proliferação e diferenciação (TOGNOLI, 2008). No momento, a fonte mais acessível para a terapia com células-tronco é a fração total de células mononucleares, obtidas da medula óssea (TOGNOLI, 2008).

Os objetivos deste trabalho foram:

- Propor uma técnica para correção da ruptura do ligamento cruzado de cães que dispense a imobilização do membro no período pós-operatório.

- Avaliar a ação da malha de polipropileno como único substituto do ligamento cruzado cranial e caudal de cães.

- Realizar uma revisão sobre as técnicas e complicações durante a obtenção de medula óssea, abordando a importância do material coletado, os equipamentos utilizados habitualmente para essa coleta, bem como os principais sítios de acesso.

- Avaliar a ação das células mononucleares autógenas, aplicadas intra-articular e em pacientes submetidos à correção cirúrgica dos ligamentos cruzados rompidos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê em Ética em Pesquisa com animais da Universidade Federal de Santa Maria, sob o nº 23081.003653/2008-59 e seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foi redigido em forma de artigos, seguindo-se as normas para a confecção de tese da UFSM (MDT, PRPGP/UFSM, 2006).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ocorrência

A ruptura do ligamento cruzado cranial (LCC) é uma das lesões mais comuns no membro pélvico e a maior causa de afecção articular degenerativa da articulação do joelho de cães (BRINKER et al., 1999), sendo rara em gatos (BENNET & MAY, 1997). A lesão do ligamento cruzado caudal (LCA) vem tendo maior relevância e espaço na literatura mundial nos últimos anos, já que sua importância é indiscutível quanto à estabilização primária da translação da tíbia sob o fêmur (CAMARGO et al., 1996). Estudos recentes sugerem que cães jovens de raças mais ativas e os animais acima do peso (MÜLLER et al., 2008) podem ser predispostos à ruptura, porém o sexo não é um fator determinante (BENNET & MAY, 1997).

O ligamento cruzado cranial, denominado pela posição relativa de sua inserção tibial (figura 1), está sob alto risco quando forçado na hiperextensão da articulação. Sua ruptura permite deslocamento anormalmente livre na direção da tíbia com relação ao fêmur (figura 2) (DYCE et al., 1997). A lesão está associada, mais comumente, à rotação interna abrupta da perna. Quando isso ocorre, os ligamentos se torcem e ficam fortemente enroscados entre si. À medida que a rotação interna progride, o LCC fica sujeito à lesão decorrente da margem caudomedial do côndilo femoral lateral, quando este gira contra o ligamento (HULSE & JOHNSON, 2002). Outro mecanismo de lesão do LCC é a hiperextensão do joelho. Quando o joelho é hiperestendido, o teto da incisura intercondilar pode agir como uma faca e transecionar o LCC (HULSE & JOHNSON, 2002).

Frequentemente, ambos os joelhos estarão afetados após um ano do diagnóstico inicial (DOVERSPIKE et al., 1993). Após a ruptura, a articulação se torna instável e surgem alterações inflamatórias como, formação de osteófitos periarticulares, osteoartrose

e lesões meniscais, particularmente o medial (JOHNSON & JOHNSON,1993; FOSSUM, 1997). Com isso, ocorre a redistribuição do peso corporal, com a finalidade de aliviar a articulação afetada, o que sobrecarrega o membro contra-lateral, favorecendo a degeneração do ligamento.

A ruptura do LCA, embora rara, está associada à ruptura do LCC (IAMAGUTI et al., 1998). Pode ser difícil diagnosticar essas rupturas isoladas, a menos que um fragmento de osso tenha sido arrancado da inserção tibial posterior, o que pode ser observado nas radiografias (MILLER III, 2007). Existem diversas pesquisas sobre a biomecânica do LCC, porém poucos estudos foram realizados sobre as propriedades biomecânicas do LCA (KOKRON, 1993), provavelmente por sua baixa ocorrência, principalmente contraposta pela frequência das rupturas do LCC.

Diagnóstico

A incidência desta lesão, talvez não seja maior, por falta de diagnóstico correto durante o exame do paciente, sendo esse diagnóstico, baseado, principalmente, nos achados clínicos. Após a lesão, os cães desenvolvem um processo inflamatório agudo na articulação, que resulta em dor (VASSEUR, 1998). Isso causa claudicação do membro afetado, que diminui com o decorrer das semanas devido à cicatrização dos tecidos adjacentes (JOHNSON & JOHNSON,1993; MUZZI et al., 2003). O cão volta a apoiar parcialmente o membro e esse apoio melhora com o passar do tempo. Entretanto, num determinado momento, o paciente apresenta um declínio ocasionado pela instabilidade da articulação e a claudicação tende a piorar após os exercícios. Isso acontece pelo desenvolvimento das alterações degenerativas da articulação (VASSEUR, 1998; PIERMATTEI & FLO, 1999; MUZZI et al., 2003).

A movimentação cranial da tíbia em relação ao fêmur é chamada de “sinal de gaveta” e é aspecto diagnóstico da afecção do ligamento cruzado, que fica nítido nos casos

de laceração completa do ligamento (BENNET & MAY, 1997; DUELAND, 1998; GAGLIARDO et al., 2004a). O ligeiro sinal de gaveta cranial pode ficar evidente em casos de ligamentos estirados ou parcialmente lacerados, mas esta situação apenas pode ser apreciada com o paciente sob anestesia geral (BENNET & MAY, 1997).

Para a realização deste exame, posiciona-se o paciente em decúbito lateral, se segura a extremidade distal do fêmur com uma mão e com a outra, apóia-se o dedo indicador sobre a tuberosidade tibial e o polegar sobre a cabeça da fíbula (MUZZI et al., 2003). Enquanto o fêmur é mantido estático, a tibia é deslocada no sentido craniocaudal, obedecendo uma direção paralela ao platô tibial (VASSEUR, 1998; PIERMATTEI & FLO, 1999; MUZZI et al., 2003). O teste é considerado positivo, quando o deslocamento da tibia em relação ao fêmur for superior a 2mm (MUZZI et al., 2003).

Existe ainda o teste de compressão tibial (MUZZI et al., 2003; GAGLIARDO et al., 2004), no qual o cão é posicionado no mesmo decúbito anteriormente descrito, com o membro voltado para cima. Uma mão é posicionada na região distal do fêmur e com a outra mão, a articulação tibiotársica é suavemente flexionada. Se o LCC estiver rompido, a tibia será projetada cranialmente em relação ao fêmur (MUZZI et al., 2003; GAGLIARDO et al., 2004b).

As rupturas parciais, dificultam a detecção da instabilidade articular ao exame clínico, pois as fibras intactas do ligamento podem limitar a movimentação cranial da tibia (MUZZI et al., 2003). Resultados falso-negativos podem ocorrer em testes de gaveta devido à fibrose periarticular associada a casos crônicos ou em situações onde há contração muscular do paciente testado, por falta de relaxação adequada (DUELAND, 1998; MUZZI et al., 2003).

Exames complementares como as radiografias, devem ser realizados em incidências ântero-posterior e perfil (VASSEUR, 1998; PIERMATTEI & FLO, 1999; SNIDER, 2000; MUZZI et al., 2003). As radiografias com incidência ântero-posterior são

realizadas, pois podem revelar avulsão na inserção tibial do ligamento cruzado cranial ou ainda da margem capsular lateral da tibia (SNIDER, 2000; PIEDADE & MISCHAN, 2007). Radiografias devem ser feitas em todos os casos de lesões do joelho, sendo fundamentais para afastar fraturas articulares, deslocamentos epifisários ou para detectar pequenas avulsões que poderão caracterizar lesões de natureza grave (AMATUZZI & ROSSI, 1992). Radiografias sob estresse ajudam no diagnóstico de lesão do ligamento cruzado, pois a compressão tibial no momento do exame radiográfico permite a visibilização do deslocamento cranial da tibia em relação ao fêmur, mesmo nos casos de ruptura parcial do LCC (KOKRON et al., 1993; MUZZI et al., 2003; GAGLIARDO et al., 2004a).

A centese articular e o exame do fluido sinovial são úteis para eliminar outras afecções do joelho (HULSE & JOHNSON, 2002). O líquido sinovial é um dialisado do sangue e sua análise laboratorial é um método prático para diagnosticar processos patológicos das articulações (GRIFFIN & VASSEUR, 1992), sendo também utilizado para avaliar o tratamento e o prognóstico (JOHNSON & JOHNSON, 1993). Pesquisadores diagnosticaram sinovite linfocitária plasmocítica (SLP) associada à ruptura de ligamento cruzado cranial de um cão e tal diagnóstico conduziu à escolha do tratamento cirúrgico, uma vez que as técnicas extra-capsulares são de eleição na suspeita ou presença de SLP (TATARUMAS, 2006).

O líquido sinovial fisiológico é claro, viscoso, possui teste de mucina positivo e teste de fibrina negativo (FERNANDEZ et al., 1983). A contagem global de células nucleadas varia de 0 a 2990/mm³. O tipo de células vistas são mononucleares (65 a 90%) com predominância de monócitos e macrófagos e poucos linfócitos e células sinoviais (JOHNSON & JOHNSON, 1993). Polimorfonucleares são raros, apresentando-se em porcentagem menor que 10 (FERNANDEZ et al., 1983). Nas rupturas do ligamento cruzado, o líquido sinovial apresenta-se límpido ou, ocasionalmente turvo. A coloração

varia de amarelo a ligeiramente avermelhado (JOHNSON & JOHNSON,1993), porém a presença de sangue no líquido sinovial pode ser devido à ruptura de vasos durante a artrocentese (GRIFFIN & VASSEUR, 1992). A viscosidade e o volume podem estar normais ou diminuídos (JOHNSON & JOHNSON,1993).

Em casos de ruptura do ligamento cruzado, o líquido sinovial da articulação do joelho pode permanecer dentro dos padrões normais, quanto aos aspectos macroscópicos. Entretanto, já se sabe que na avaliação de cães submetidos à desmotomia do cruzado cranial, o líquido pode apresentar características inflamatórias e padrão não degenerativo por até 90 dias (DE BIASI et al., 2001).

O exame artroscópico permitiu aos ortopedistas um grande avanço no diagnóstico das doenças articulares. Puderam ser detectados com precisão as lesões internas do joelho e, desta forma, adequar às condutas necessárias para o tratamento das alterações (AMATUZZI et al., 2007). Trata-se de uma técnica endoscópica que demanda intenso treinamento para a sua realização e permite um exame rico em minúcias, que traz informações significativas, capazes de ajudar a elucidar as afecções articulares que acometem a espécie canina. As diferenças entre o diagnóstico artroscópico e a confirmação após artrotomia, concentraram-se na diferenciação entre ruptura completa e parcial do ligamento cruzado cranial e na afecção de menisco (TATARUNAS 2006). O procedimento artroscópico tem sido considerado como diagnóstico definitivo, embora exija grande habilidade técnica do artroscopista e de sua interpretação dos achados (YAZAKI et al., 1995).

No ano de 1999, em um estudo, utilizou-se a artroscopia para confirmar diagnóstico de lesão no ligamento cruzado cranial, em pacientes previamente submetidos à tomografia computadorizada (YAZAKI et al., 1995; SARAIVA et al., 1999). Compararam-se os resultados dos exames de 108 pacientes com diagnóstico sugestivo de lesão meniscal. Como conclusão, obteve-se que a precisão da tomografia

computadorizada, em relação aos diagnósticos dados pela artroscopia, foi de 91,7% de acerto, atestando assim a sua eficácia (YAZAKI et al., 1995). No entanto, esse ainda é um exame de acesso restrito em medicina veterinária.

Contudo, a artroscopia não se restringe apenas a um exame diagnóstico, mas também uma alternativa cirúrgica de acesso minimamente invasivo ao interior das articulações (AMATUZZI et al., 2007; MILLER III, 2007). Em estudo prospectivo, avaliaram-se 20 pessoas com ruptura de LCC. Dez pacientes foram submetidos à correção cirúrgica por via artroscópica e dez submetidos à reconstrução aberta tradicional por artrotomia (BOSCHIN et al., 2002). Os resultados obtidos permitiram afirmar que a reconstrução artroscópica foi capaz de reproduzir os resultados da reconstrução por artrotomia, oferecendo reabilitação pós-operatória com menos dor e melhora da amplitude de movimento e trofismo muscular mais acelerado. Entretanto, isso ocorreu inicialmente, uma vez que a partir do terceiro mês as diferenças entre a maioria dos dados analisados não foram mais significativas (BOSCHIN et al., 2002).

Os demais métodos diagnósticos incluem a ressonância magnética, que apesar do elevado custo dos equipamentos, fornece dados complementares importantes ao diagnóstico de ruptura dos ligamentos cruzados e de lesões nas cartilagens e meniscos (AMATUZZI & ROSSI, 1992; ROCKWOOD et al, 1994; MUZZI et al., 2003). Tem-se ainda o exame ultra-sonográfico, que permite a visibilização dos tecidos moles intracapsulares, sendo um método não-invasivo (MILLER III, 2007; MUZZI et al., 2003). Apesar de toda a gama de métodos disponíveis para o diagnóstico desta afecção, os autores deste trabalho afirmam que não se deve evitar um tratamento cirúrgico por falta de exames complementares mais sofisticados, já que uma correta avaliação clínica, com o animal sob sedação, e o estudo radiográfico simples, são capazes de diagnosticar as rupturas do ligamento cruzado.

Tratamentos

As lacerações do ligamento cruzado podem ser tratadas por procedimentos cirúrgicos ou conservadoramente. O tratamento conservador é melhor tolerado em pacientes com massa corporal inferior a 10kg (VASSEUR, 1998). A aplicação de bandagem e o confinamento por quatro a oito semanas foi relatado com sucesso e função satisfatória na maioria dos cães de pequeno porte (VASSEUR, 1998; PIERMATTEI & FLO, 1999). A estabilização cirúrgica é recomendada naqueles de qualquer tamanho para assegurar a função ótima (VASSEUR, 1998; HULSE & JOHNSON, 2002), embora seja realmente indicada nos cães de maior porte (BENNETT & MAY, 1997).

Em estudo recente realizados em humanos, buscou-se responder as seguintes questões: “O tratamento cirúrgico é imperativo na lesão do ligamento cruzado cranial? Há lugar para o tratamento conservador?”. Foram revisadas as mais modernas e conceituadas obras nacionais e internacionais e ao final do estudo, afirmou-se que é possível tratar conservadoramente a lesão do LCC e que, portanto, o tratamento cirúrgico não é imperativo. Afirmou-se ainda que quando indicado, o tratamento conservador deve ser planejado considerando-se o grau de distensão decorrente da lesão dos ligamentos periféricos (AMATUZZI et al., 2007).

Alguns autores garantem que não há técnica cirúrgica que estacione o desenvolvimento ou a progressão da afecção articular degenerativa (PIERMATTEI & FLO, 1999). O que se espera, é que ocorra menor acometimento com a estabilização cirúrgica do que sem a intervenção (PIERMATTEI & FLO, 1999). Após o relato da primeira técnica desenvolvida em 1952 por Paatsama, que foi a técnica de criação de túneis ósseos no fêmur e na tíbia com posterior passagem de tira de fáscia lata autógena como substituto do LCC, várias técnicas de reparo do LCC vem sendo desenvolvidas (VASSEUR, 1998).

A terapia cirúrgica divide-se em técnicas de reconstituições intra e extra-articulares do ligamento cruzado cranial, sendo técnicas que compartilham igual popularidade entre os cirurgiões veterinários. O método escolhido para um paciente específico é uma questão de preferência do cirurgião, visto que os estudos prospectivos têm mostrado o índice de êxito próximo a 90%, independente da técnica (WARZEE et al., 2001; HULSE & JOHNSON, 2002; SCHULZ & STIFLE, 2007).

Os métodos extra-articulares envolvem grande variedade de técnicas de estabilização para a articulação do joelho deficiente do ligamento cruzado cranial (TOMLINSON, 2001). A maioria delas utiliza sutura de grosso calibre para diminuir a instabilidade articular (figura 3). Estas abordagens funcionam melhor em cães de raças menores, pois frequentemente têm sido consideradas insatisfatórias em animais de porte maior e atletas com ruptura deste ligamento (PIERMATTEI & FLO, 1999). Conferem estabilidade articular devido ao espessamento dos tecidos periarticulares em resposta ao procedimento cirúrgico e às suturas implantadas (GAGLIARDO et al., 2004). A fibrose da cápsula articular e estruturas adjacentes, estabilizam parcialmente a articulação (VASSEUR, 1998; MUZZI et al., 2003), mas não suficientemente para impedir sua deterioração contínua (PIERMATTEI & FLO, 1999; ZAMPROGNO, 2007a).

Após a descoberta do envolvimento do ângulo do platô tibial na predisposição à ruptura do LCC, foi desenvolvida a técnica cirúrgica de osteotomia niveladora do platô tibial (TPLO), que consiste na osteotomia, rotação e estabilização da porção proximal da tíbia, alterando a mecânica da articulação para obter estabilização pela restrição ativa da articulação do joelho (ZAMPROGNO, 2007b).

Pesquisadores observaram que a sutura extra-capsular de estabilização lateral e a TPLO em cães, apresentaram resultados similares e superiores à estabilização intra-articular (CONZEMIUS et al., 2005). A técnica de interligação extra-capsular fêmoro-fabelo-tibial é eficiente na estabilização imediata da articulação de cães com ruptura do

LCC, oferecendo recuperação funcional ao reduzir o deslocamento cranial e a rotação interna da tíbia, porém não impede a progressão da osteoartrite (ZAMPROGNO, 2007b). Em um estudo, utilizou-se a fásia lata autógena como estabilizador extra-articular do joelho de cães de grande porte e os autores obtiveram conclusões idênticas aos pesquisadores anteriormente citados (CONZEMIUS et al., 2005).

As técnicas extra-articulares são consideradas vantajosas em cães de menor porte (VASSEUR, 1998; PIERMATTEI & FLO, 1999) e necessárias quando há lesão ligamentar crônica, pois as alterações existentes dentro da articulação criam um ambiente adverso para a utilização de uma técnica de reparo intra-articular (PIERMATTEI & FLO, 1999).

A reconstituição intra-articular consiste em substituir anatomicamente o ligamento cruzado, passando tecido autógeno, homogêneo ou material sintético através de orifícios a trépano feitos previamente no fêmur e/ou na tíbia (FAUSTINO, 1996; IAMAGUTI et al., 1998; VASSEUR, 1998; HULSE & JOHNSON, 2002; FAUSTINO, 2003; SALBEGO et al., 2007). Um exame *in vitro* de vários métodos de reparação indicou que os reparos intra-articulares resultam em movimentação articular mais próxima do fisiológico do que os extra-articulares. Sendo assim, é o método indicado para cães acima de 17 kg, já que esses dependem mais da estabilização cirúrgica do que os cães pequenos. Cabe lembrar, que a estabilização intra-articular é especialmente indicada na lesão aguda do animal atleta (PIERMATTEI & FLO, 1999).

Os problemas vinculados à utilização de enxerto nas técnicas intra-articulares são: na fase de remodelamento, na qual o enxerto pode deformar ou afrouxar caso o pós-operatório não seja satisfatório (GAGLIARDO et al., 2004b) e o local de inserção, onde há grande dificuldade de se encontrar os pontos isométricos (VASSEUR, 1998). Existem controvérsias na literatura em relação à área mais isométrica do LCA (KOKRON et al., 1993). Avaliaram-se doze artigos que estudavam a isometricidade do LCA e concluiu-se

sobre a importância da correta inserção do implante, especificamente no fêmur (KOKRON et al., 2001). Observou-se que quando há modificação na inserção do ligamento na tíbia, isso resulta em pequenas alterações na isometricidade, enquanto as mudanças da localização de pontos no fêmur podem causar grandes variações da isometricidade, exigindo, assim, maior cuidado na fixação dos implantes ou perfuração de túneis no fêmur (KOKRON et al., 2001).

Os implantes intra-capsulares, podem ser biológicos (autólogos ou conservados) ou sintéticos. Em geral, os enxertos biológicos necessitam de um período mínimo de 20 semanas para serem revascularizados e sofrerem fibroplasia com consequente organização de colágeno. Os materiais mais frequentemente utilizados para a reconstrução do ligamento são os aloenxertos constituídos de tendão patelar (CAMANHO & VIEGAS, 2001; FAUSTINO, 1996; VASSEUR, 1998, SALBEGO et al., 2007), fásia lata (figura 4) (IAMAGUTI et al., 1998, VASSEUR, 1998; PENHA et al., 2007), ou de combinações destes dois materiais (VASSEUR, 1998).

A bibliografia cita a utilização do tendão do músculo semitendinoso como substituto do LCC de coelhos (PEREIRA et al., 2000). Submetidos a teste de tração após a eutanásia dos animais, verificou-se integração do enxerto nos túneis femoral e tibial. Contudo, os autores esclarecem a intenção da continuidade desse estudo para uma utilização futura do material em cães. Outro estudo utilizou enxertos autólogos de tendões flexores do joelho na reconstituição do LCA e concluiu que a utilização de duas bandas permitiu uma melhora da frouxidão em 80% dos pacientes e afirmou que o uso dos tendões flexores facilitou a reabilitação pós-operatória (FAUSTINO, 2003).

Os enxertos autógenos têm a conveniência de a coleta ser diretamente do paciente (figura 4) e apresentar ausência de resposta imune. Porém, a grande desvantagem é a resistência inferior, quando comparada com o ligamento natural (VASSEUR, 1998). Avaliaram-se 35 cães submetidos à reconstrução do LCC com fascia lata unipediculada e

os autores concluíram, através de exames subjetivos, que esta técnica permite boa estabilização das superfícies articulares e permite recuperação completa da capacidade funcional do membro afetado (IAMAGUTI et al., 1998).

Os enxertos homólogos têm a vantagem de poderem ser coletados em grandes quantidades. No entanto, a desvantagem da utilização desse tipo de enxerto é a resposta imune gerada e a inconveniência da coleta e armazenamento (VASSEUR, 1998). Em pesquisa recente, utilizou-se a glicerina a 98% na conservação de segmento teno-ósseo homólogo de patela (SALBEGO et al., 2007). Observou-se que a conservação dos implantes por 30 dias o cuidado de reidratação por 24 horas em solução salina com iodo povidine e o uso profilático de antibiótico, asseguraram ausência de infecção e sinais clínicos ou histológicos de incompatibilidade com o receptor.

Em outro estudo, substituiu-se experimentalmente, o LCC de cães por pericárdio bovino conservado em glicerina 99,5%. De acordo com os resultados dos exames clínicos e radiográficos, o pericárdio bovino não conferiu estabilidade articular, levando, conseqüentemente, ao processo degenerativo, e não pôde ser recomendado como xenoenxerto para a substituição do ligamento cruzado cranial de cães (BRENDOLAN et al., 2007).

Os materiais sintéticos oferecem a conveniência da disponibilidade em condições simples de armazenamento, ausência da morbidade associada à coleta do enxerto, e a capacidade de planejar a prótese sob medida. Além de serem usados como enxertos, os materiais sintéticos podem ser usados junto com os enxertos biológicos com o intuito de proteger ou fortificar (CAMARGO et al., 2001). Dentre estes materiais estão o poliéster (COHEN et al., 1994; SILVA & MUNIZ et al., 1994; FUCHS, 1995; FARAH et al., 1997; CAMARGO et al., 2001), o náilon (OLIVEIRA et al., 2003), teflon, polipropileno (GOISSIS et al., 2001) e a fibra de carbono (FARAH et al., 1997).

Vinte e dois pacientes que utilizaram implante artificial para o tratamento da instabilidade crônica do joelho, foram avaliados clinicamente e concluiu-se que o ligamento artificial de poliéster trançado, quando indicado adequadamente em pacientes selecionados, proporciona bons resultados (FARAH et al., 1997). Também associou-se material sintético (fio de mononilon) no reforço de implantes biológicos (tendão homólogo) conservados em glicerina 98%, porém sugeriu-se não se tratar de um substituto confiável para a correção da ruptura do LCC em cães, devido à ruptura do material por fadiga (OLIVEIRA et al., 2003).

Estudos anteriores já informavam esses resultados com avaliação a médio prazo de pacientes com próteses de poliéster na reparação da lesão crônica do LCC (CAMARGO et al., 2001). Concluiu-se que a implantação de próteses ligamentares, para reconstrução do LCC, leva a resultados inicialmente satisfatórios, que tendem a deteriorar-se em médio prazo. Por essa razão, quase sempre é útil combinar as reconstituições intra e extra-articulares de modo que aumente o grau de estabilização articular (HULSE & JOHNSON, 2002).

Com o objetivo de evitar complicações durante o período pós-operatório, alguns cirurgiões optam pela imobilização do membro operado. Para isso, existem as imobilizações externas, como as muletas de Thomas (PENHA et al., 2007) e as ataduras de Robert Jones (PIERMATTEI & FLO, 1999) ou as internas, como a transfixação percutânea (Ehmer-Kirschner) (SALBEGO et al., 2007) ou a olecranização da patela (SILVA & MUNIZ, 1994). Essas imobilizações temporárias da articulação garantem a integridade dos implantes, contudo podem resultar em graus consideráveis de rigidez articular após a retirada dos aparelhos de fixação.

O fato de se imobilizar a articulação dificulta o cuidado pós-operatório, comprometendo o funcionamento da articulação. Isso causa aderências intra-articulares e não permite que o próprio animal inicie o apoio do membro ao solo voluntariamente. Cabe

ressaltar que a articulação livre, favorece também o trabalho do fisioterapeuta, o qual oferece importante suporte adjuvante ao tratamento desses pacientes (VEIGA et al., 2007).

Terapia celular

As terapias celulares prometem, de forma parcial, propor respostas ao que era considerado um desafio. O tratamento com células-tronco, também conhecido como medicina regenerativa, propõe o reparo ou a substituição de tecidos que sofreram alguma lesão ou degeneração (OLIVEIRA, 2008).

As primeiras células-tronco adultas identificadas com caráter de pluripotencialidade foram as do sistema hematopoiético, que derivam de uma única célula-mãe, totipotente, denominada célula-tronco hematopoiética, de modo que todas possuem uma origem comum (LIANG & BICKENBACH, 2002). Essas células-tronco têm como característica principal a capacidade de auto-renovação e a pluripotencialidade (LIANG & BICKENBACH, 2002).

As células da medula óssea podem sofrer dois processos de diferenciação: as células mononucleares (indiferenciadas) e as multinucleares. Dentre as células mononucleares, existe a hematopoiética, que originará células do sangue (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas) e a mesenquimal, que poderá originar células musculares, hepatócitos, osteócito, tecido adiposo, condrócitos e estroma (SOUZA et al., 2005).

A utilização de células de medula óssea de indivíduos adultos abriu um novo horizonte na medicina reparadora, (por não envolver as questões filosóficas, éticas e religiosas observadas com a utilização de células-tronco embrionárias) onde não há possibilidade de rejeição imunológica (já que as células são autólogas) nem a necessidade de estoque de células em bancos de tecidos (já que o estoque aparentemente é inesgotável e ainda é possível expandí-las em cultura) (MOTA et al., 2005).

Após estímulo apropriado, surge um compartimento de células já comprometidas com uma determinada linhagem hematológica: as células formadoras de colônias (CFC), que são reconhecidas morfológicamente como as precursoras imediatas das diversas células maduras presentes no sangue periférico (SILVEIRA, 2000). Estas células possuem capacidade de se diferenciar de acordo com o meio ambiente local e migram sempre atraídas por fatores da inflamação aguda (SOUZA et al., 2005). Nos últimos anos, a utilização de células-tronco através do transplante de medula óssea, tem se tornado cada vez mais comum (GALLACHER et al., 2000; CUTLER & ANTIN, 2001).

A plasticidade das células-tronco adultas (CTA) refere-se à capacidade das mesmas de originar diferentes tipos de células maduras. Sabe-se hoje que a plasticidade deste tipo celular, que originalmente era considerada muito restrita, é bastante considerável. Diferentes tipos de CTA apresentam diferentes graus de plasticidade, desde muito baixo (como as CT epiteliais) até muito alto (como as CT mesenquimais). Os mecanismos responsáveis por essa plasticidade não são ainda bem determinados (NARDI, 2004).

Grupos de pesquisa em terapia celular, têm encontrado diferentes resultados, dando origem assim a uma controvérsia ainda não resolvida. Enquanto alguns sugerem que CTAs podem realmente se transdiferenciar (isto é, originar tipos celulares diferentes dos que constituem o órgão onde residem), outros afirmam que esses resultados são artefatos da metodologia empregada ou originam-se da fusão das células-tronco com células já diferenciadas presentes nos órgãos alvo (NARDI, 2004).

Outra incerteza é o melhor local de administração das células-tronco. Diversas vias de administração foram utilizadas experimentalmente sendo que, até agora, não se comprovou qual seria a melhor, e não se sabe se haveria exatamente um número mínimo ou máximo de células a serem utilizadas (OTERO et al., 2009). Há indícios de que uma

maior quantidade de células foi encontrada quando estas foram administradas pela via intra-lesional (ANDERSON et al., 2005)

Mais recentemente, pesquisas têm ressaltado a importância da concentração de células da medula óssea para a eficácia da terapia. HERNIGOU et al. (2005) trataram 60 pacientes que apresentavam não-união óssea na diáfise da tíbia, com concentrado de medula óssea autóloga, onde 300 ml de medula foram reduzidas a um volume de 50 ml através de centrifugação e separação celular, permanecendo apenas a fração mononuclear da medula óssea. Esse concentrado foi injetado percutaneamente no tecido fibroso interfragmentar, no foco da não união. Foi observada reversão da não união e consolidação óssea em 53 casos, onde foi injetado um número > 1500 progenitores/cm³ e em torno de 54 CFU-Fs (colony forming units). Entretanto, nos sete pacientes que não apresentaram boa resposta à terapia celular, a injeção foi de apenas 634 progenitores/cm³ e 19 CFU-Fs, quantidade considerada pelos autores insuficiente para promover a reversão da enfermidade em questão (ZAMPROGNO, 2007a).

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) derivadas da medula óssea, do cordão umbilical ou, até mesmo, do sangue periférico, podem ser identificadas com o auxílio de um anticorpo monoclonal dirigido contra o antígeno de superfície CD34 (NAKAGE & SANTANA, 2006). Na medula óssea, as células CD34 positivas (+) representam, apenas, 1 a 2 % das mononucleares, porém são capazes de dar origem aos precursores de todas as linhagens hematopoiéticas, evidenciando a habilidade das CTH de reconstituir a hematopoiese em primatas, camundongos e cães após mielossupressão (NAKAGE & SANTANA, 2006).

A porcentagem média de células CD34 + é 10 a 18% na medula óssea de cães com duas a três semanas de idade e menos de 5% na medula óssea de cães com mais de três meses de idade (NAKAGE & SANTANA, 2006). Portanto, a porcentagem de células CD34 + de cães declina com a idade.

O estudo da regeneração da articulação do joelho, com ou sem lesão do osso subjacente, há muito vem sendo objeto de preocupação dos ortopedistas (CAFALLI et al., 1993). Acreditava-se que a cartilagem articular possuía pequena capacidade de regeneração em resposta a diferentes tipos de lesão, como o atrito e a instabilidade provocada pela ruptura do ligamento cruzado (PRIDIE, 1959, VASSEUR, 1998). Trabalhos mais recentes, entretanto, demonstraram que a cartilagem é um tecido metabolicamente ativo e apresenta capacidade de resposta a alguns estímulos, melhorando seu processo de reparação (WANG et al., 2005).

GONÇALVES et al. (2008) sugerem que o tratamento com sulfato de condroitina estimula a atividade metabólica do condrócito, minimizando as lesões ocorridas durante a doença articular degenerativa (DAD). ARIAS et al. (2003) demonstraram diminuição do processo inflamatório articular de paciente tratados com a associação de ácido hialurônico e sulfato de condroitina. Entretanto, afirmam que benefícios similares são obtidos com a estabilização cirúrgica como único tratamento, sugerindo não haver diferença quando se emprega essa associação medicamentosa e substituição do ligamento rompido. Não se tem resultados com células-tronco intra-articular como coadjuvantes no tratamento da DAD.

O potencial das células tronco esqueléticas como ferramentas de engenharia tecidual já é uma realidade, entretanto, o uso dessas células para corrigir processos patológicos, está longe de ser uma realidade clínica e esconde mecanismos ainda desconhecidos pela comunidade científica.

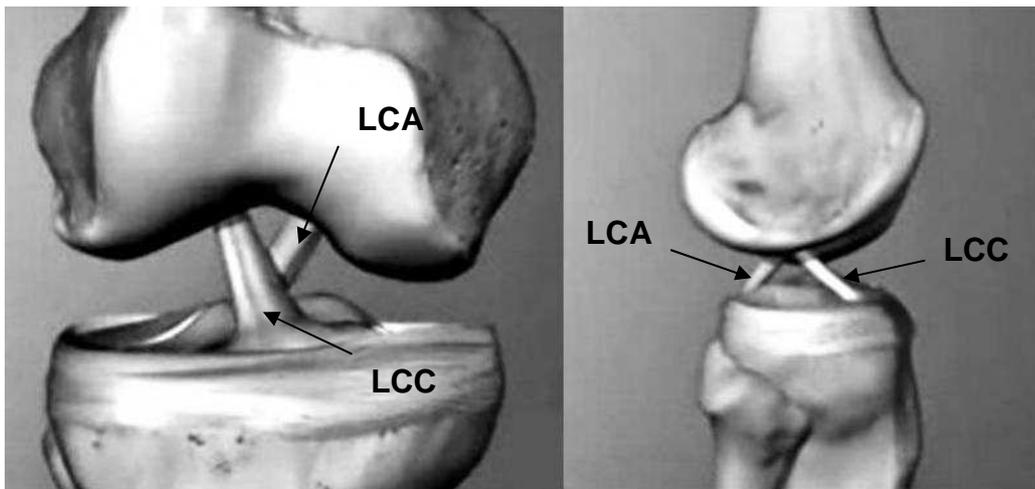


Figura 1 – Imagens representativas dos ligamentos cruzados cranial (LCC) e caudal (LCA) na visão cranial (direita) e lateral (esquerda).

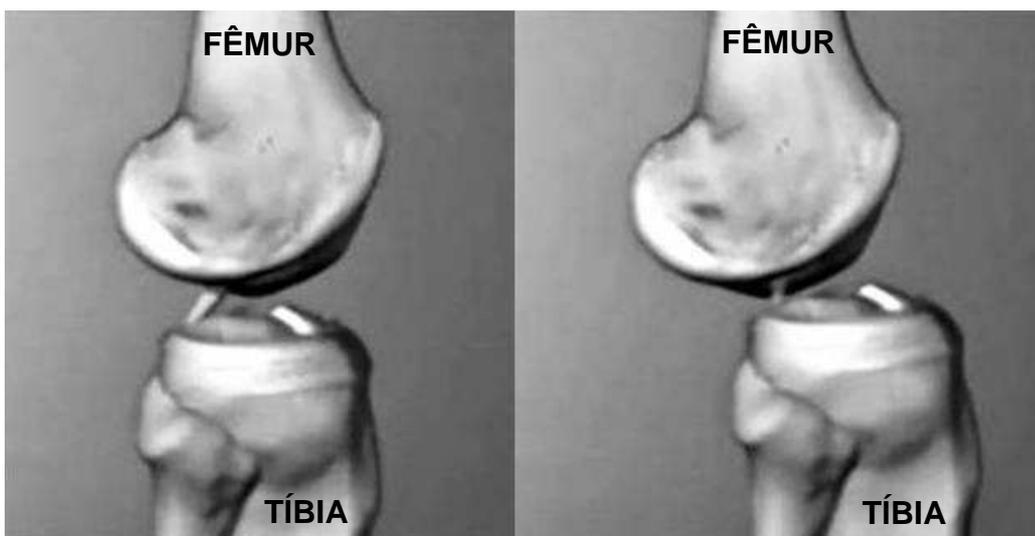


Figura 2 – Imagens representativas do LCC rompido. Percebe-se a projeção cranial da tíbia em relação ao fêmur quando há ruptura do LCC.

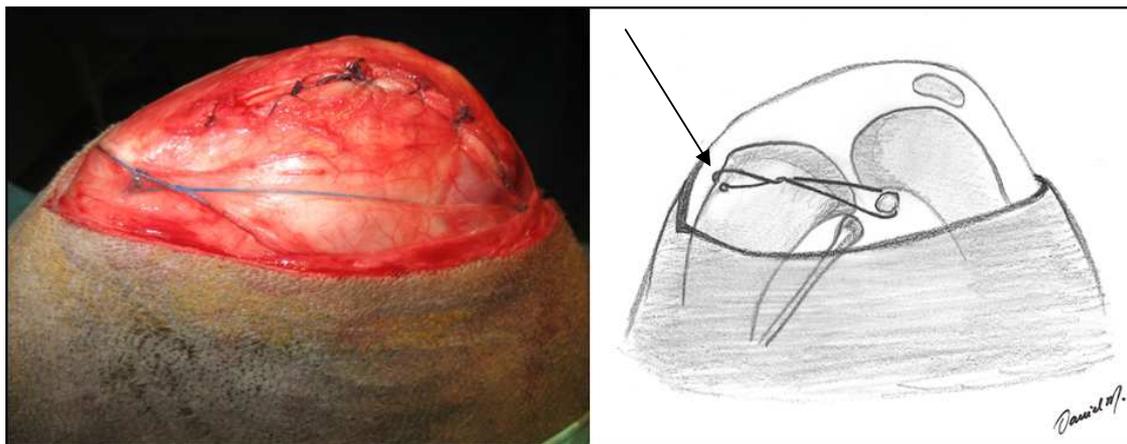


Figura 3 – Técnica extra-articular utilizando sutura de grosso calibre para diminuir a instabilidade articular. Os pontos de ancoragem do fio: sutura atrás da fabela (no fêmur) e orifício criado na crista da tíbia (seta). (Créditos: Daniel Curvello de Mendonça Müller)



Figura 4 – Cão, da raça Pit Bull, com ruptura do ligamento cruzado cranial. Seqüência da técnica intra-articular de substituição do ligamento cruzado cranial, com retalho unipediculado de fáscia lata. Em (A), observa-se a delimitação da fáscia lata. (B) Retalho unipediculado de fáscia lata isolado da musculatura. (C) Imagem do novo ligamento emergindo do orifício confeccionado no fêmur. (D) Resultado final da sutura cutânea após correção intra-articular do ligamento cruzado cranial com retalho unipediculado de fáscia lata. (Créditos: Daniel Curvello de Mendonça Müller)

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**EMPREGO DE IMPLANTE SINTÉTICO – MALHA DE
POLIPROPILENO – PARA PROMOVER A ESTABILIZAÇÃO
ARTICULAR, APÓS DESMOTOMIA DOS LIGAMENTOS
CRUZADOS EM CÃES – PROPOSIÇÃO DE TÉCNICA**

Daniel Curvello de Mendonça Müller, Ney Luiz Pippi, Paula Cristina Basso, João Eduardo Wallau
Schossler, Maurício Borges da Rosa, Gabriele Maria Callegaro Serafini

CIÊNCIA RURAL, outubro de 2009

**EMPREGO DE IMPLANTE SINTÉTICO – MALHA DE POLIPROPILENO –
PARA PROMOVER A ESTABILIZAÇÃO ARTICULAR, APÓS DESMOTOMIA
DOS LIGAMENTOS CRUZADOS EM CÃES – PROPOSIÇÃO DE TÉCNICA**

Daniel Curvello de Mendonça Müller¹, Ney Luiz Pippi², Paula Cristina Basso⁵, João Eduardo
Wallau Schossler⁶, Maurício Borges da Rosa³, Gabriele Maria Callegaro Serafini⁷

-ARTIGO CIENTÍFICO-

RESUMO

A ruptura do ligamento cruzado (LC) é uma lesão diagnosticada em grande parte dos cães com problemas articulares, sendo a causa mais comum de afecção articular degenerativa da articulação do joelho. Este trabalho objetivou avaliar clinicamente a ação da malha de polipropileno como único substituto do ligamento cruzado cranial e caudal de cães, ressaltando particularidades da técnica aqui proposta. Foram utilizados 20 cães, submetidos à desmotomia unilateral dos LC cranial e caudal. Vinte e um dias após a ruptura, todos foram tratados cirurgicamente pela técnica de redução aberta, com o implante de polipropileno substituindo apenas o ligamento cruzado cranial (LCC). A técnica proposta demonstrou rápida execução e pouca dissecação de tecidos moles, retorno precoce à deambulação, resistência adequada do implante sem associação de imobilização externa e ausência de reação articular até os 90 dias de pós-operatório.

Palavras-chave: Implantes; articulação; ruptura de ligamento cruzado

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS. Rua Acadêmico Rigoberto Duarte, nº70 – ap 501 Bairro Ns. de Lourdes, cep 97060030. Santa Maria cmdaniel@terra.com.br

² Departamento de Clínica de Pequenos animais da UFSM, RS.

³ Curso de Medicina Veterinária da UFSM, RS

ABSTRACT

The ligament rupture (LC) is a lesion diagnosed in most dogs with joint problems, and the most common cause of degenerative joint disease of the knee joint. This study aimed to evaluate clinically the action of a polypropylene mesh as the only substitute for cranial cruciate ligament and flow of dogs, highlighting features of the technique proposed here. Twenty dogs underwent unilateral desmotomy of cranial and caudal LC. Twenty-one days after the break, all were treated surgically by the technique of open reduction, with implantation of polypropylene replacing only the cranial cruciate ligament (CCL). The proposed technique has shown rapid implementation and low soft tissue dissection, early return to ambulation, adequate strength of the implant without associated external immobilization and lack of joint reaction until 90 days after surgery.

Key words: Implants; joint; cruciate ligament rupture

INTRODUÇÃO

A ruptura do ligamento cruzado cranial (LCC) é uma das lesões mais comuns no membro pélvico, sendo uma importante causa de afecção articular degenerativa da articulação do joelho de cães (BRINKER et al., 1999). Estudos sugerem que cães jovens de raças mais ativas e os animais acima do peso (MULLER et al., 2008) podem ser predispostos à ruptura, porém o sexo não é um fator determinante (BENNETT & MAY, 1997).

O LCC, denominado pela posição relativa de sua inserção tibial, está sob alto risco quando forçado na hiperextensão da articulação. Sua ruptura permite a translação cranial da tíbia com relação ao fêmur (DYCE et al., 1997; BANWELL et al., 2005). Alguns pesquisadores afirmam que não há técnica cirúrgica que estacione o desenvolvimento ou a progressão da afecção articular degenerativa. O que se espera, é que ocorra menor

acometimento com a estabilização cirúrgica do que sem a intervenção (PIERMATTEI & FLO, 1999).

A reconstrução intra-articular consiste em substituir anatomicamente o ligamento cruzado cranial, passando tecido autólogo, homólogo ou material sintético através de orifícios a trépano feitos previamente no fêmur e/ou na tíbia (FAUSTINO, 1996; IAMAGUTI et al., 1998; VASSEUR, 1998; HULSE & JOHNSON, 2002; FAUSTINO, 2003; SALBEGO et al., 2007). Um exame *in vitro* de vários métodos de reparação indicou que os intra-articulares resultam em movimentação articular mais normal do que os extra-articulares. Por isso é o mais indicado para casos de lesão aguda do animal atleta (PIERMATTEI & FLO, 1999).

Os materiais sintéticos oferecem a conveniência da disponibilidade em condições simples de armazenamento, ausência da morbidade associada à coleta do enxerto e a capacidade de planejar a prótese sob medida. Além de serem usados como enxertos, os materiais sintéticos podem ser usados associados aos enxertos biológicos, com o intuito de proteger ou fortificar (CAMARGO et al., 2001). HOTH et al. (1985) utilizaram enxerto autólogo associado à tiras de polipropileno nas correções intra-articulares de ligamento cruzado cranial, e obtiveram melhores resultados quanto a frouxidão e sinais clínicos e radiográficos no grupo com polipropileno associado ao enxerto. Condromalácia patelar foi observada em ambos os grupos, mas nenhuma reação adversa ao implante sintético foi identificada (HOTH et al., 1985).

O objetivo deste trabalho foi avaliar de forma clínica, a ação da malha de polipropileno como único substituto do ligamento cruzado cranial e caudal de cães, ressaltando particularidades da técnica aqui proposta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 20 cães adultos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria, com massa corporal médio de $7,73 \pm 2,57$ kg. Todos foram submetidos a exames radiográficos do membro pélvico direito, na busca de alterações pré-existentes. Os animais foram desverminados, e passaram por um período de adaptação mínimo de 20 dias. Todos eles sofreram desmotomia dos ligamentos cruzados cranial e caudal, por meio de artrotomia do membro pélvico direito, 21 dias antes da correção cirúrgica.

Para tanto, após devidamente preparados para o procedimento cirúrgico, os animais receberam a medicação pré-anestésica, composta de maleato de acepromazina ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ via intramuscular [IM]) e citrato de fentanila ($5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ IM), seguida, após 15 minutos, de indução anestésica com propofol (4 mg kg^{-1} via intravenosa [IV]) para aplicação da anestesia epidural. A analgesia trans-operatória foi obtida pela ação da epidural de cloridrato de lidocaína 2% ($0,125 \text{ ml kg}^{-1}$) associada a cloridrato de bupivacaína 0,5% ($0,125 \text{ ml kg}^{-1}$).

Realizou-se a incisão lateral à patela, até abertura da cápsula articular. Deslocou-se a patela medialmente e com a articulação sob flexão máxima, identificaram-se os ligamentos cruzados. Com o bisturi, seccionaram-se as duas bandas do LCC e o ligamento cruzado caudal (LCA), sem a remoção dos mesmos. A capsulorrafia se deu com padrão de sutura em Wolff, seguido de sutura contínua simples no tecido sub-cutâneo e Wolff na pele. Os fios utilizados foram mononáilon nº 3-0, ácido poliglicólico nº 3-0 e mononáilon nº 3-0 respectivamente.

Os cães receberam medicação antiinflamatória composta por paracoxibe ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ IM) durante cinco dias. Foram separados em dois grupos, conforme o tempo de avaliação

pós-operatória (PO) sendo os animais do grupo A, avaliados macroscopicamente por artrotomia aos 50 dias PO e os do grupo B, aos 90 dias.

A malha de polipropileno foi preparada composta por quatro camadas, não permitindo evidência de bordas desfiadas ou abrasivas, conforme demonstrado na Figura 1. Convencionou-se a largura final da malha de 0,5cm, suturada ao centro com fio de polipropileno número 3-0. Como comprimento padrão do implante, adotou-se o de 16 cm, e estes implantes foram autoclavados e estocados pelo período máximo de 25 dias.

Vinte e um dias após a desmotomia, procedeu-se à correção cirúrgica. A medicação pré-anestésica constou de maleato de acepromazina ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ via IM) e citrato de fentanila ($5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ via IM), seguida, após 15 minutos, de indução anestésica com propofol (4 mg kg^{-1} via IV). A manutenção da anestesia se deu com halotano vaporizado em circuito semi-aberto com oxigênio. A analgesia trans-operatória foi obtida pela ação da epidural de cloridrato de lidocaína 2% ($0,125 \text{ ml kg}^{-1}$) associada a cloridrato de bupivacaína 0,5% ($0,125 \text{ ml kg}^{-1}$), administrado após a indução anestésica. No período pós-operatório, a analgesia foi assegurada com cloridrato de tramadol (4 mg kg^{-1} via IM) e paracoxibe ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ via IM) durante cinco dias. A oxacilina sódica (30 mg kg^{-1} via IV) foi utilizada como profilaxia antimicrobiana, 30 minutos antes do procedimento cirúrgico.

A cirurgia consistiu de acesso lateral à articulação do joelho direito mediante incisão desde o terço distal do fêmur até a tuberosidade tibial, abertura da cápsula articular e luxação medial da patela (Figura 2A). Os resquícios dos ligamentos rompidos foram identificados, fixados com uma pinça Halsted e excisados com lâmina de bisturi. O tecido adiposo infra-patelar foi mantido íntegro. Perfurou-se o fêmur com broca de vídea número 3,5mm, no sentido médio-lateral da articulação, conforme demonstrado na Figura 2B. Depois de introduzido o implante ao longo deste túnel ósseo (Figura 2C), fixou-se a extremidade proximal do implante à epífise distal do fêmur, com uma cerclagem de fio de aço cirúrgico 2mm, fixando o material em dois momentos.

No fêmur, perfurou-se a epífise distal em seu ponto médio e o fio de aço foi passado dobrado, deixando uma alça para a colocação do implante. As extremidades do fio, emergidas na cortical oposta, retornaram para serem fechadas sobre o implante, percorrendo uma dorsal e a outra ventral ao fêmur (Figura 2D).

A borda superior do implante foi dobrada e suturada ao restante da malha com dois pontos isolados de fio mononáilon, formando uma “alça” e acomodando o nó do fio de aço (Figura 3). A tibia foi perfurada no sentido centro-medial e a malha foi transpassada por este orifício. Com o membro em extensão, a fixação se deu pela colocação de uma hemicerclagem de fio de aço, conforme Figura 2D. Irrigou-se a articulação abundantemente com solução salina isotônica, antes da redução da luxação patelar. Procedeu-se à síntese da cápsula articular com fio mononáilon 3-0 em pontos de Wolff, enquanto o membro foi mantido em extensão. Após a capsulorrafia, o implante foi tensionado até sua extensão máxima para a posterior fixação à tibia com uma hemicerclagem no sentido proximal-caudal, conforme demonstrado na Figura 2D. A redução do espaço morto ocorreu com sutura contínua utilizando-se fio de ácido poliglicólico 3-0 e a pele foi suturada com fio mononáilon 3-0 em pontos de Wolff.

Este estudo baseou-se em avaliações clínica e radiográfica. A avaliação clínica constou de observação visual da locomoção, dor à manipulação do membro, presença de crepitação e teste de instabilidade articular com o animal anestesiado, todos conforme tabelas sugeridas por PENHA et al. (2007). A integridade do implante foi avaliada cirurgicamente por artrotomia do membro aos 50 e 90 dias pós-operatórios, conforme a distribuição dos grupos, quando também coletou-se líquido sinovial para análise.

No estudo radiológico avaliou-se o crescimento de qualquer estrutura intra-articular no dez primeiros animais operados, adotando-se como critério, os graus: (0) Sem alteração da superfície articular; (1) Irregularidade da superfície articular; (2) Saliência da

superfície articular com leve projeção radiopaca; (3) Saliência da superfície articular com acentuada projeção radiopaca.

Utilizou-se para a aferição do movimento articular, a comparação com o membro contralateral (sadio). Considerando o membro sadio com movimentação ausente, dividiram-se os escores em: ausente (sem movimentação), discreto (discreta movimentação cranial da tíbia em relação ao fêmur) e moderado (movimentação acentuada da tíbia), semelhante à avaliação de PENHA et al. (2007). Considerando que na ausência de ambos os ligamentos a articulação apresenta-se acentuadamente instável, percebeu-se que um único implante foi capaz de restaurar a dinâmica articular, com exceção dos três animais que apresentaram comprometimento do implante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica se mostrou de fácil execução, exigindo pouca dissecação da região operada e mínima utilização de instrumental especializado. Isso facilita a sua realização fora dos grandes centros cirúrgicos. O tempo médio de cirurgia foi de $55,8 \pm 8,34$ minutos, o que permitiria que todo o procedimento fosse realizado sob ação da anestesia epidural, diminuindo os riscos e os custos anestésicos.

Optou-se pela desmotomia tanto do ligamento cranial quanto do caudal, para avaliar a ação mecânica do implante de polipropileno como único estabilizador intra-articular do joelho. A correção foi realizada 21 dias após a ruptura, conforme preconizam SILVA & MUNIZ (1994). Esses autores informam que as cirurgias corretivas realizadas precocemente em suas rotinas foram as que apresentaram maior número de complicações pós-operatórias.

Quanto à técnica cirúrgica propriamente dita, pode-se destacar a forma de fixação do implante. No fêmur o implante foi fixado duas vezes, sem que houvesse excesso de material. Além disso, o fato da cerclagem ser fechada sobre o implante garantiu que

quando este fosse dobrado (Figura 3B), o nó do fio de aço permanecesse protegido, evitando lesões aos tecidos adjacentes. A dupla fixação ao fêmur permitiu ainda que o implante fosse tracionado, sem risco de ruptura, para ser fixado à tibia com a hemicerclagem. O fato de a tibia ser um osso triangular em sua diáfise proximal, fez com que se evitasse a realização da cerclagem completa ao redor do osso, pois além de instável nesta região, estrangularia uma grande porção muscular. Optou-se pela fixação em “U”, sendo tracionado na porção medial do membro, acomodando-se o nó contra o osso. Não houve ruptura de nenhuma fixação, tanto no fêmur quanto na tibia, durante o período de avaliação dos 20 animais operados.

Os problemas vinculados à utilização de enxertos nas técnicas intra-articulares ocorrem na fase de remodelamento, na qual o enxerto pode deformar ou afrouxar caso o pós-operatório não seja satisfatório (GAGLIARDO et al., 2004). Na busca de evitar complicações neste período, alguns cirurgiões optam pela imobilização do membro operado. PENHA et al. (2007), após utilizarem fásia lata autógena na correção do ligamento cruzado rompido, imobilizaram o membro no pós-operatório com muleta de Thomas modificada, durante 14 dias, em todos os pacientes, sendo que apenas um animal (7%) apresentou ruptura cinco semanas após o procedimento. SALBEGO et al. (2007), após substituírem o ligamento cruzado cranial de cães por segmento teno-ósseo homólogo conservado em glicerina a 98%, imobilizaram a articulação por quatro semanas, pelo método de transfixação percutânea (Ehmer-Kirschner). Esta imobilização garantiu a integridade de todos os implantes até o momento da biópsia, contudo resultou em um grau considerável de rigidez articular após a retirada do aparelho de fixação aos 30 dias de pós-operatório.

No experimento aqui relatado, não houve qualquer imobilização externa da articulação ao longo dos 90 dias de avaliação. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, contudo eram soltos em solário por duas vezes durante o dia, todos juntos,

sem qualquer restrição da movimentação. O fato de não se imobilizar a articulação, facilita o cuidado pós-operatório, preservando-se a função da articulação, evitando aderências intra-articulares e além de permitir que o próprio animal inicie o apoio do membro ao solo voluntariamente. Cabe ressaltar que a articulação livre, favorece também o trabalho do fisioterapeuta, o qual oferece importante suporte adjuvante ao tratamento desses pacientes (VEIGA et al., 2007).

A média do tempo de retorno ao apoio do membro ao solo foi de $8,85 \pm 4,43$ dias. Este dado refere-se ao início da utilização do membro, considerando os diferentes graus de claudicação, incluindo o apoio apenas quando em estação. Tal dado torna-se de extrema importância, considerando que segundo VEIGA et al. (2007), o trabalho de reabilitação deve priorizar a flexão e extensão articular para impedir a perda de amplitude do movimento. A utilização do membro ao caminhar é uma movimentação ativa e envolve movimentos de flexão e extensão, portanto, precocidade ao apoio é desejada e é sinônimo de reabilitação.

Dos 20 animais operados, dois (10%) apresentaram o implante rompido no momento da artrotomia e um (5%) apresentou o implante parcialmente rompido. Considerando que esses resultados partiram da situação onde somente um único implante substituiu os dois ligamentos (cranial e caudal), acredita-se que quando o material for empregado em associação ao ligamento caudal íntegro, apresentará uma estabilidade ainda maior. Pelo mesmo motivo, foi observado movimento de gaveta discreto no membro operado de 17 animais e moderado nos três que apresentaram alterações físicas do implante.

MENDENHALL et al. (1987) utilizaram prótese trançada de polipropileno em 17 cães, e tiveram como resultado ruptura parcial ou total de todos os implantes até os 10 meses. Atribuíram o insucesso à viscoelasticidade excessiva do dispositivo e a falha por fadiga. Ainda assim, cabe ressaltar que o implante utilizado na pesquisa aqui proposta,

apresentou 4 camadas, diferentemente do utilizado por MENDENHALL et al. (1987), o qual só apresentava uma camada. Além disso, têm-se o fato de que um único implante intra-articular do trabalho aqui proposto, apresentou resultados clínicos altamente satisfatórios até os 90 dias.

A avaliação do líquido sinovial foi prejudicada pelo pequeno volume obtido (0,4ml). Das 20 amostras enviadas ao laboratório, 15 puderam ser avaliadas citologicamente. A contagem total de células nucleadas variou de 1000 a 4800, com média de 1500 células/ μ L. Na avaliação citológica diferencial foram visualizadas células mononucleares (macrófagos, monócitos, células mesoteliais, sinoviócitos, plasmócitos, linfócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos). Na contagem diferencial, uma amostra apresentou celularidade típica de doença inflamatória aguda, contendo 90% de neutrófilos segmentados. Entretanto, o restante das amostras manteve um padrão crônico, com celularidade mononuclear variando de 65 a 100%.

De acordo com a distribuição dos tipos celulares visualizados na análise citológica das amostras, verifica-se a ocorrência de doença crônica (degenerativa), devido à predominância em células mononucleares, principalmente linfócitos e macrófagos (JOHNSON & JOHNSON, 1993; WILKINS, 1993). Outro aspecto observado foi reatividade em células mesoteliais, linfócitos e macrófagos, indicando reação articular degenerativa. De acordo com BENNETT et al. (1988) e JOHNSON & JOHNSON (1993), os dados encontrados na análise do líquido sinovial são compatíveis com um processo degenerativo de natureza não inflamatória, provavelmente ocasionado pela instabilidade articular remanescente.

De 10 cães avaliados aos 50 dias após a cirurgia, um (10%) apresentava claudicação discreta durante a marcha e um (10%) apresentava claudicação constante ao caminhar. Dos 10 cães avaliados aos 90 dias, apenas um (10%) apresentava claudicação discreta durante a marcha. Esses três animais com alteração da marcha nos momentos das

respectivas avaliações foram os mesmos que romperam parcial ou totalmente o implante. Os demais não apresentaram claudicação, apoiando completamente o membro durante a atividade física ou em estação. Esses resultados superam o tempo médio para o retorno funcional do membro operado, que varia em torno de quatro meses (ELKINS, 1991; MOORE & READ, 1996).

As avaliações clínicas aconteceram antes da cirurgia, e aos 50 dias (grupo A) ou 90 dias (grupo B) após a correção cirúrgica. Dezoito cães (90%) apresentaram ausência de dor, permitindo o exercício passivo de todos os movimentos fisiológicos da articulação sem apresentar relutância ao exame. Dois animais (10%) apresentaram dor discreta, permitindo que a articulação fosse manipulada embora apresentando sinais de desconforto articular, como voltar o focinho em direção ao avaliador durante o exame, sem vocalizar. Não se evidenciou qualquer sinal clínico de rejeição do implante utilizado, como produção acentuada de líquido sinovial, inflamação local ou perda da função articular.

Dez cães (50%) não apresentaram qualquer sinal de crepitação articular, seis (30%) apresentaram crepitação discreta (presença de crepitação durante os extremos de flexão e extensão passivas) e quatro animais, (20%) crepitação moderada (crepitação intermitente durante a flexão e extensão passivas) de acordo com os critérios de avaliação de PENHA et al. (2007). Acredita-se que a razão pela qual foi observada a crepitação nos animais deste trabalho, está no fato de existir algum grau de instabilidade articular, conforme CHIERICHETTI et al. (2001). Estes autores associaram a crepitação discreta em dois pacientes que apresentaram leve irregularidade na superfície articular, sobre o orifício da tibia, visualizada ao estudo radiográfico.

A avaliação radiográfica constou de duas projeções (antero-posterior e latero-lateral), nos momentos: antes da desmotomia (articulação sadia), antes da correção cirúrgica (21 dias após a desmotomia) e antes da biópsia (máximo período de permanência do implante, antes da sua remoção). Dos animais avaliados, apenas 1 (10%) apresentou

grau 1 de irregularidade sobre o orifício da tíbia, havendo sinais compatíveis com crepitação discreta (PENHA et al., 2007), sem ocorrência de dor ou claudicação do membro.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a malha de polipropileno, na forma como foi utilizada, é um material que oferece resistência adequada, para estabilizar parcialmente a articulação do joelho, na ausência dos ligamentos cruzados cranial e caudal. A técnica proposta exigiu pouca dissecação dos tecidos moles e permitiu total estabilidade na fixação do implante sintético ao osso. Utilizar um único implante sintético para substituir ambos os ligamentos cruzados (cranial e caudal), devolve a estabilidade articular e a função fisiológica do membro, mas não impede a permanência de um grau leve de movimento de gaveta e conseqüentemente a progressão da DAD.

COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê em Ética em Pesquisa com animais da Universidade Federal de Santa Maria, sob o nº 23081.003653/2008-59 e seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

REFERÊNCIAS

- BANWELL, M.N. et al. In Vitro Evaluation of the 18 and 36 kg Securos Cranial Cruciate Ligament Repair System. **Veterinary Surgery**. Philadelphia. v.34, n.3, p.283-288, 2005.
- BENNETT, D.; MAY, C. Moléstias articulares de cães e gatos In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4ed. São Paulo: Manole, cap.149, v.2, p.2817-2818, 1997.

BENNETT, D., TENNANT, B., LEWIS, D.G., *et al.* A reappraisal of anterior cruciate ligament disease in the dog. **Journal Small Animal Practice**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 275-297, 1988.

BRINKER, W.O.; PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. São Paulo. Manole, cap.17, p.480-537, 1999.

CAMARGO, O.P.A. et al. Resultado a médio prazo da reconstrução da lesão crônica do ligamento cruzado anterior com prótese de poliéster. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.36, n.4, p.111-116, 2001.

CHIERICHETTI, A.L.; ALVARENGA, J.; PEDRO, C.R. et al. Ruptura do ligamento cruzado cranial. estudo comparativo da técnica extra-articular com enxerto autógeno de fáschia lata com e sem artrotomia exploratória. **Clínica Veterinária**. São Paulo, v.4, n.33, p.34-42, 2001.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. O. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, cap.17, p.370, 1997.

ELKINS, D.A.; PECHMAN, R.; KEARNEY, M.T. et al. A retrospective study evaluating the degree of degenerative joint disease in the stifle joint of dogs following surgical repair of anterior cruciate ligament rupture. **Journal of the American Animal Hospital Association**. South Bend, v.27, p.533-540, 1991

FAUSTINO, C.A.C. Técnica cirúrgica de reconstrução do ligamento cruzado posterior com uso de enxerto do tendão patelar. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.31, n.2, p.143-150, 1996.

FAUSTINO, C.A.C. Reconstrução do ligamento cruzado posterior com os enxertos dos tendões dos músculos flexores do joelho. **Acta Ortopédica Brasileira**. São Paulo, v.11, n.2, p.95-101, 2003.

GAGLIARDO, K.M.; SPIRONELLI, D.B.; EIMANTAS, G.C. Métodos de tratamento para a ruptura completa do ligamento cruzado cranial em cães – revisão. **Arquivo Apadec**, Maringá, n.8, 2004.

HOTH, J.H. et al. Polypropylene braid augmented and nonaugmented intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction. **American Journal of Sports Medicine**. Baltimore, v.13, n.5, p.321-336, 1985.

HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L. Tratamento da doença In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 1º ed. São Paulo: Roca, cap.30, p.1058-1070, 2002.

IAMAGUTI, P.; TEIXEIRA, R.B.; PADOVANI, C.F. Ruptura do ligamento cruzado em cães. Estudo retrospectivo da reconstituição com fásia lata. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.34 n.2 p.131-138, 1998.

JOHNSON, J.M., JOHNSON, A.L. Cranial cruciate ligament rupture. Pathogenesis, diagnosis and postoperative rehabilitation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 717-733, 1993.

MENDENHALL, H.V. et al. Evaluation of the polypropylene brain as a prosthetic anterior cruciate ligament replacement in the dog. **American Journal of Sports Medicine**, Baltimore, v.5, n.6, p.543-546, 1987.

MOORE, K.W.; READ, R.A. Rupture of the cranial cruciate ligament in dogs - part I. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. Auburn, v.18, n.3, p.223-234, 1996.

MULLER, D.C.M; SCHOSSLER, J.E.W; PINHEIRO, M. Adaptação do índice de massa corporal humano para cães. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, n.4, p.1038-1043, 2008.

PENHA, E.M. et al. Pós-operatório tardio da substituição do ligamento cruzado cranial no cão **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.59, n.5, p.1184-1193, 2007.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. A articulação fêmur-tíbio-patelar **Manual de ortopedia e tratamento dos pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, cap.17, p.496-512, 1999.

SALBEGO, F.Z. et al. Substituição do ligamento cruzado cranial por segmento teno-ósseo homólogo conservado em glicerina a 98%. Estudo experimental em cães. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.37, n.2, p.438-442, 2007.

SILVA, C.H.B.; MUNIZ, R.C. O uso do ligamento sintético nas lesões ligamentares agudas graves do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.29, n.5, p.299-302, 1994.

VASSEUR, P.B. **Articulação do joelho**. In: SLATTER, D. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. São Paulo: Manole, p.2156-2185, 1998.

VEIGA, P.H.A. et al. Correlação entre a análise histológica e avaliação funcional do joelho de pacientes submetidos à reconstrução do ligamento cruzado anterior. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. São Carlos, v. 11, n. 4, p. 253-260, 2007.

WILKINS, R. J. Joint serology. In: BOJRAB, M. J. **Pathophysiology in small animal surgery**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981. p.553-556.

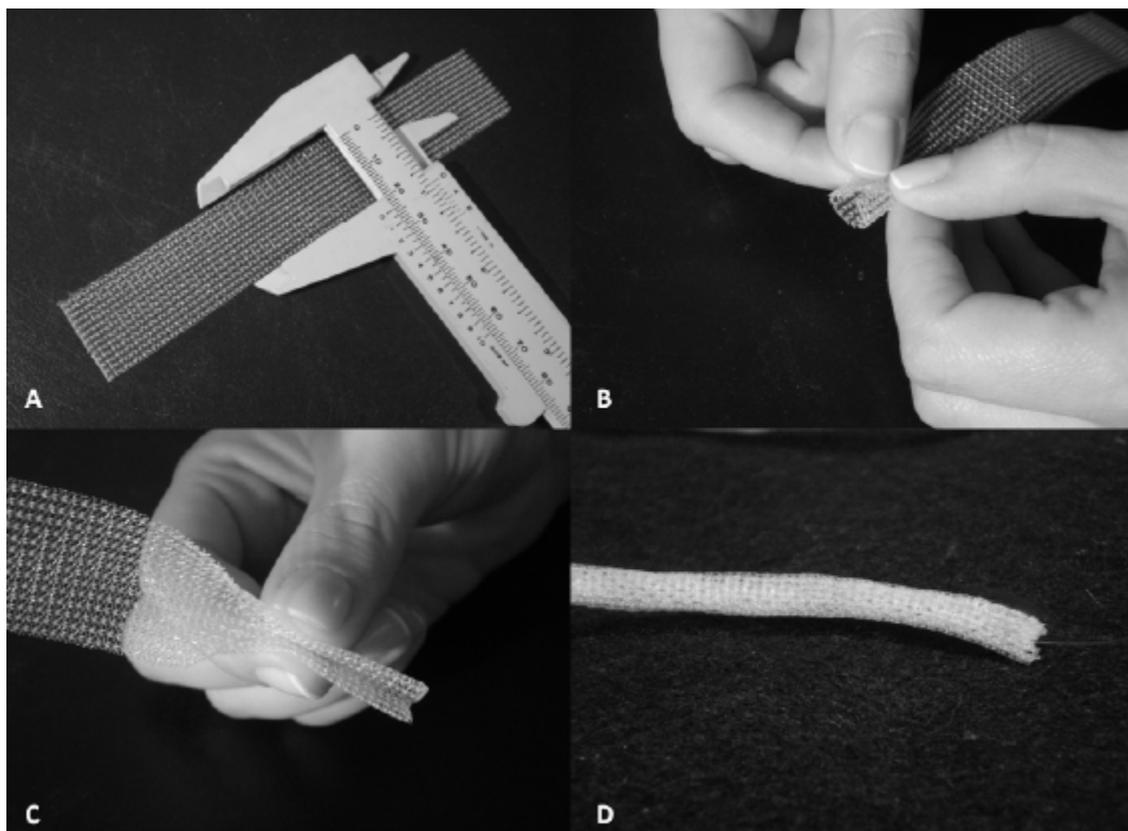


Figura 1 – Confeções do implante - (A) Padronização da largura de 2,3cm da malha de polipropileno, antes da dobra. (B) Dobragem das extremidades voltando-as para o ponto central da malha. (C) Dobragem da malha ao meio, resultando em um implante de aproximadamente 0,5cm, considerando que se perde 0,1cm de largura em cada uma das 3 dobras. (D) Fixação da malha através de sutura contínua com fio de polipropileno, ao centro do implante. (Créditos: Daniel Curvello de Mendonça Müller)

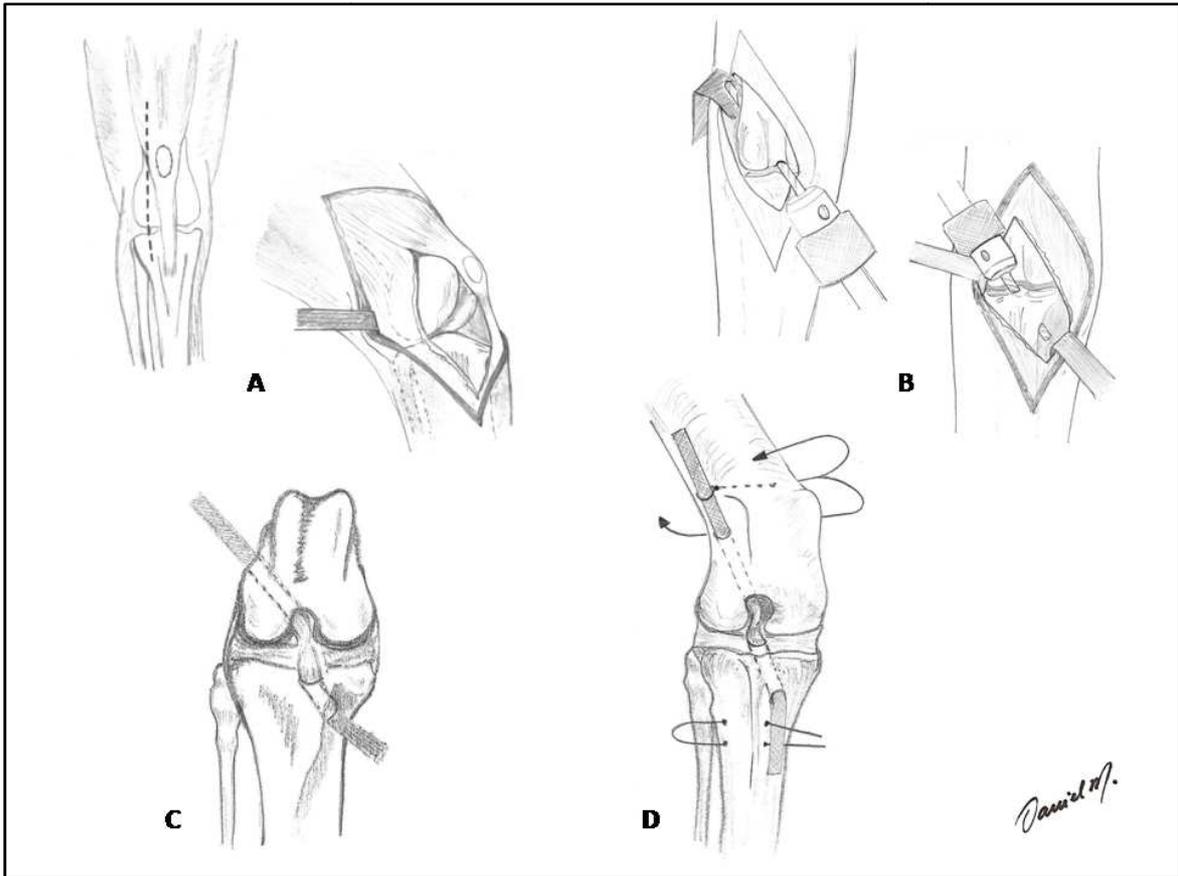


Figura 2 – Sequência cirúrgica – (A) Incisão lateral ao longo do fêmur e exposição da articulação. (B) Confeção do túnel ósseo no fêmur e confecção do túnel ósseo na tíbia. (C) Trajeto do implante de LCC por dentro dos túneis ósseos. (D) Fixação do implante no fêmur (fixação dupla) e na tíbia (hemicerclagem).

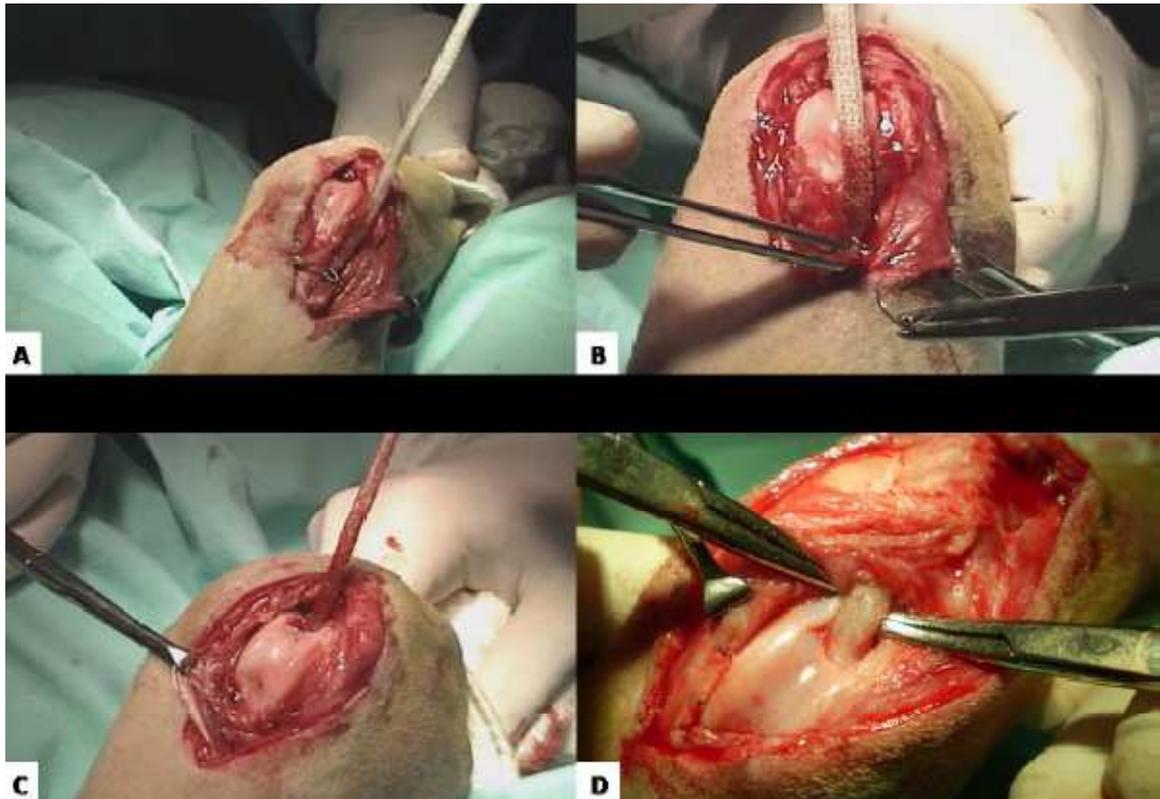


Figura 3 – (A) Imagem do fio de aço fechado sobre o implante. (B) Sutura no implante, formando uma alça envolvendo o nó da cerclagem. (C) Implante fixado ao fêmur emergindo na porção central da articulação. (D) Imagem do implante aos 90 dias após a sua colocação. Observa-se o crescimento tecidual ao longo do implante e a sua integridade. (Créditos: Daniel Curvello de Mendonça Müller)

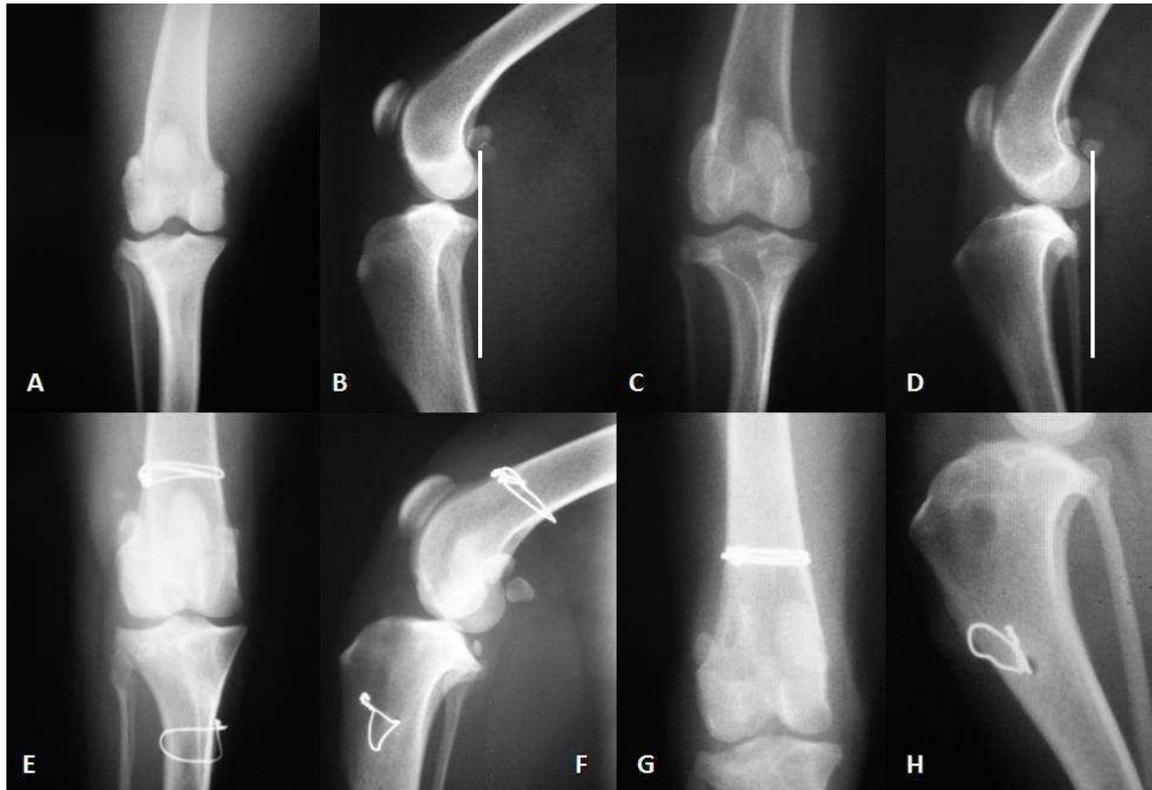


Figura 4 – Imagem antero-posterior (A) e latero-lateral (B) da articulação saudável. Repara-se que em B, o fêmur e a tíbia estão alinhados em suas porções caudais. Imagem antero-posterior (C) e latero-lateral, demonstrando projeção cranial da tíbia em relação ao fêmur (D) da articulação 21 dias após a desmotomia dos LCC e LCA. Imagem antero-posterior (E) e latero-lateral (F) dos fios de cerclagem utilizados para a fixação do implante ao fêmur e à tíbia. (G) Detalhe da fixação da cerclagem ao fêmur; (H) Detalhe de fixação da cerclagem à tíbia. (Créditos: Daniel Curvello de Mendonça Müller)

4. CAPÍTULO 2

TRABALHO PUBLICADO:

TÉCNICAS E SÍTIOS DE COLETA DE MEDULA ÓSSEA EM CÃES E GATOS

Daniel Curvello de Mendonça Müller, Ney Luis Pippi, Paula Cristina Basso, Débora
Cristina Olsson, Eduardo de Bastos Santos Junior, Antônio Cezar Oliveira Guerra

CIÊNCIA RURAL, agosto de 2009

TÉCNICAS E SÍTIOS DE COLETA DE MEDULA ÓSSEA EM CÃES E GATOS

Daniel Curvello de Mendonça Müller^{4*} Ney Luis Pippi⁵ Paula Cristina Basso⁸ Débora
Cristina Olsson⁶ Eduardo de Bastos Santos Junior⁸ Antônio Cezar Oliveira Guerra⁷

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

Atualmente, o incremento das pesquisas enfoca a medula óssea como fonte potencial para o tratamento de doenças, uma vez que seu uso como diagnóstico já é largamente empregado. Os objetivos deste artigo são revisar os melhores acessos à medula óssea e destacar a importância desse material como diagnóstico e tratamento de doenças. São abordadas particularidades sobre as técnicas de coleta e as complicações observadas pelos autores, a fim de facilitar os procedimentos, tornando-os mais seguros.

Palavras-chave: cães; gatos; biópsia; medula óssea; punção biópsia aspirativa.

ABSTRACT

Currently, the research focuses on bone marrow as a potential source for the treatment of diseases, since its use as a diagnosis is already largely employed. This paper aims to promote a practical review on the best access to the bone marrow and the

⁴ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. e-mail: cmdaniel@terra.com.br. Autor para correspondência.

⁵ Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁶ Hospital de Clínica Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil.

⁷ Hospital Veterinário Universitário, Setor de Radiologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

importance of this material as diagnosis and treatment. Sampling techniques are observed and detailed by the authors, in order to facilitate the procedures and make them safer.

Key words: dogs, cats; biopsy; bone marrow; aspiration cytology.

INTRODUÇÃO

A medula óssea tem como principal função a hematopoiese de células eritróides, granulocíticas, megacariocíticas e linfocitárias. Nos animais em crescimento, a hematopoese ocorre no interior dos ossos longos e chatos. À medida que o animal envelhece, a região do canal medular é substituída por tecido adiposo, confinando a medula ativa nos locais onde há osso esponjoso, ou seja, epífises e metáfises ósseas (RASKIN, 1998).

A coleta de medula óssea é indicada visando o diagnóstico (DOMINIS et al., 2005) e a obtenção de células pluripotenciais para o tratamento de doenças (SILVA & MACEDO, 2006). De posse dessa amostra de medula óssea, é possível realizar diversos exames, como o mielograma, a partir da preparação em lâmina, a citometria de fluxo, a imunohistoquímica e, ainda, a citogenética convencional. Dessa forma, a avaliação ideal da celularidade medular requer a integração das informações obtidas, tanto do aspirado, quanto da biópsia, à luz dos achados da avaliação do sangue periférico (FLEURY, 2007). Células-tronco, obtidas a partir de aspirados de medula óssea, são utilizadas em pacientes portadores de leucemia. Esse uso é cada vez mais explorado como terapia celular de recomposição da celularidade medular e do sangue periférico. Essas novas técnicas estão sendo aplicadas em um amplo espectro de doenças humanas, incluindo muitos tipos de câncer, doenças neurológicas, como Parkinson, diabetes e doenças cardíacas (AZEVEDO & RIBEIRO, 2000; SILVEIRA et al., 2005).

Em medicina veterinária, as pesquisas envolvendo transplante de células-tronco hematopoiéticas vêm crescendo (OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI et al., 2009).

ZAMPROGNO (2007) demonstrou que a terapia autóloga com células-tronco provenientes da medula óssea mostrou-se efetiva para a estimulação osteogênica de não união de fraturas. BRUNELLI et al. (2007) avaliaram os efeitos do transplante de células-tronco autógenas do limbo esclerocórneo de cães sobre lesões córneo-limbais. Constataram que a vantagem do transplante está em possibilitar a melhoria da transparência da córnea, sem intercorrências oculares.

Contudo, para a obtenção de células hematopoiéticas, é necessária a sua coleta e, para tanto, a aspiração intraóssea da medula, utilizando-se agulhas específicas em locais onde se obtém maior abundância desse material. Geralmente, as punções ocorrem na crista ilíaca, no trocanter maior do fêmur, na área trans-ilíaca e na região epifisária proximal do úmero. O material deve ser coletado em condições assépticas, com o paciente sob anestesia geral, e devem ser utilizadas seringas contendo anticoagulantes para realizar a sucção da medula óssea (RASKIN, 1998).

O objetivo deste artigo é realizar uma revisão sobre as técnicas e complicações durante a obtenção de medula óssea, abordando a importância do material coletado, os equipamentos utilizados habitualmente para essa coleta, bem como as principais vias de acesso, conforme a espécie do animal.

Indicações de coleta da medula óssea

Normalmente a coleta de medula óssea (MO) é conduzida visando a obtenção de fragmentos para realização de mielograma, indicado em situações bem precisas. Este consiste no exame direto das células da MO, colhidas por punção aspirativa, e permite verificar a normalidade da produção sanguínea, as alterações no aspecto celular e a presença de células neoplásicas (AQUINO et al., 2002). Geralmente é solicitado quando se encontram alterações no hemograma (GOSSET, 2000), tais como neutropenia persistente, trombocitopenia, leucocitose, morfologia anormal de células sanguíneas, presença

inexplicável de células imaturas no sangue, anemia arregenerativa ou ainda uma combinação dessas enfermidades (GALE et al., 1981). Também pode ser usado após um quadro de hiperproteinemia, quando há suspeita de mieloma múltiplo, alguns casos de linfoma, leishmaniose, brucelose, erliquiose e doenças sistêmicas de origem fúngica, entre outras (AQUINO et al., 2002). Pode-se ainda indicar a causa de hipercalcemia quando associada com neoplasmas (OLIVEIRA, 2008).

SOBRINHO et al. (1979) conduziram mielogramas em 22 crianças portadoras de má nutrição protéica (MNP) e puderam observar hiperplasia de série branca e sinais de deficiência de fatores de maturação expressos pela presença de macrocitose e macronormoblastose na quase totalidade das crianças. Observaram, ainda, ausência ou escassez de depósitos de ferro em 17 casos (77%).

O mielograma é indispensável, por exemplo, para o diagnóstico e a classificação das leucemias mielóides e linfóides agudas. Nessa doença, um grande número de células tumorais, chamadas blastos, é encontrado no interior da MO (LUND, 2000).

Diferentemente do exame anterior, que consiste em examinar as células medulares a partir de uma preparação citoscópica, a biópsia de MO (BMO) permite avaliar também toda a sua estrutura, pois ela é feita a partir de um fragmento compacto de osso. Tal procedimento é utilizado na prática médica, principalmente para o diagnóstico de doenças hematológicas ou metastáticas (AQUINO et al., 2002). Praticamente não existe contra-indicação, sendo esse procedimento realizado inclusive em animais portadores de doenças hemorrágicas sem observação de maiores danos (JAIN, 1993).

Embora a aspiração de MO seja um procedimento menos traumático do que a BMO, esta última fornece dados importantes como o grau de celularidade medular e o diagnóstico de enfermidades como mielofibrose, mieloesclerose e focos de infecção, além de avaliar a quantidade de gordura presente no interior da medula (LUND, 2000).

WIJewardana et al. (2007) isolaram e caracterizaram células progenitoras da medula óssea de cães com diagnóstico de leucemia ou linfoma maligno.

Outra indicação da coleta de medula óssea por aspiração é o transplante de células da MO e o cultivo celular para aquisição de células mononucleares, células-tronco hematopoiéticas ou células-tronco mesenquimais (TOGNOLI et al., 2009). As células-tronco (CT) são tipos especiais de células, que estão presentes principalmente nos embriões (CT embrionárias), no cordão umbilical, no fígado fetal e na medula óssea (CT adultas) (SILVEIRA et al., 2005). Em cães, a presença de células-tronco hematopoiéticas tem sido observada na medula óssea (BRUNO et al., 2001; NAKAGE et al., 2005) e no sangue do cordão umbilical (NAKAGE & SANTANA, 2006). Vários estudos demonstraram a grande plasticidade dessas células adultas ao se diferenciarem em músculo esquelético, osso, cartilagem, gordura e fígado, o que se torna uma esperança para o tratamento de diversas doenças. Essas células apresentam também um vasto potencial na terapia de doenças cardíacas (SILVEIRA et al., 2005).

Agulhas de coleta

Em 1929, utilizou-se pela primeira vez a punção aspirativa da medula óssea para o estudo citológico sistemático, propiciando o reconhecimento e a descrição das células precursoras (CURY, 2003). Três décadas mais tarde, Macfarland relatou as vantagens da retirada de um fragmento ósseo, utilizando a agulha de Silverman. Com esse método, obtinha-se uma maior quantidade de material medular, o que possibilitava maior número de cortes e de colorações histológicas. Em 1971, Jamshidi criou uma nova agulha para a realização de BMO, a qual apresentava a vantagem de ser menos traumática e mais confortável ao manuseio (CURY, 2003). A agulha original de Jamshidi foi modificada por Inwood alguns anos depois, a fim de melhorar a obtenção do material celular (CURY, 2003).

Desde então, existem diversas agulhas para uso clínico, de diversas procedências (RASKIN, 1998). Tais agulhas servem, tanto para a administração de diversos produtos sanguíneos, soluções e agentes farmacológicos em situações de urgência, quanto para coleta de material para exames cito e histopatológicos e transplantes (JUNIOR et al., 2008). Os autores desta revisão sugerem como equipamentos de eleição para infusões intraósseas as agulhas de Jamshidi ou agulhas de mielograma. Por meio destas, pode-se acoplar um equipo e administrar soluções, considerando que estudos demonstram que substâncias injetadas na medula óssea são distribuídas imediatamente na circulação sistêmica (JUNIOR et al., 2008).

Quando é necessária uma quantidade elevada de medula óssea, sugere-se a utilização de agulhas com o calibre maior do que as citadas anteriormente, a fim de aumentar o volume coletado (OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI et al., 2009) em menor tempo cirúrgico. Situações assim são requeridas nas coletas visando à obtenção de células para transplantes de medula óssea nos casos de pacientes oncohematológicos e transplantes de células-tronco obtidas do isolamento da fração total colhida, o que difere dos cultivos celulares, que requerem uma quantidade menor de células da medula óssea. No isolamento, a quantidade de medula óssea a ser colhida é maior, pois nesse material deverá conter o número de células suficientes para o transplante. Esse número é de aproximadamente 10^6 células. Para tanto, podem ser utilizadas as agulhas de Osgood diâmetro 30 x 12 (LOPES et al., 1998), a agulha de Steis (OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI et al., 2009), a agulha de Rosenthal (RASKIN, 1998) ou a agulha Jamshidi (SAMOTO, 2006; ZAMPROGNO, 2007). Além disso, CASTANIA (2007) utilizou agulha hipodérmica do tamanho 40 x 12mm para obtenção de pequena quantidade de medula óssea.

Em pesquisas realizadas pelos autores, utilizou-se a agulha de Steis na coleta de medula óssea em gatos (figura 1) e cães (figuras 2 e 3), assim como nos trabalhos de OLIVEIRA, (2008) e TOGNOLI et al. (2009), e obteve-se o volume desejado de MO para

transplante autólogo, em tempos de coleta de 18,4 minutos \pm 4,21. Apesar de a agulha utilizada apresentar diâmetro aparentemente elevado em relação ao osso, como visto nas figuras 1, 2 e 3, sabe-se, por meio dos princípios de estabilização de fraturas, que o canal medular pode ser preenchido em 60 a 70% com pinos de Steinmann, sem que isso acarrete prejuízo vascular do córtex ósseo (EL-WARRAK & SCHOSSLER, 1998). Sendo assim, os autores desta revisão adotam esse parâmetro para a determinação do tamanho da agulha em relação ao tamanho do osso. Para tanto, certifica-se, por meio do estudo radiográfico (figura 1), que a agulha não preencherá mais do que 70% do canal medular ósseo, evitando danos vasculares.

Principais vias de acesso para coleta de células medulares hematopoiéticas

Em cães e gatos, a medula óssea pode ser obtida na epífise dos ossos longos e nas regiões do ílio, como crista ilíaca ou borda acetabular (figura 1A, 3D,3E, 3F). RASKIN (1998) sugere a coleta na crista ilíaca de cães, pela facilidade de localização. Diversos autores utilizaram a referida via de acesso para coleta de medula óssea, tanto para obtenção de células mononucleares, quanto para aquisição de células medulares, em exames cito-histopatológicos (HANS et al., 2005; SAMOTO, 2006; VAZ, 2006; CASTANIA, 2007; ZAMPROGNO, 2007; SALGADO, 2008). Contudo, em cães de pequeno porte ou gatos, a coleta de amostras medulares é facilitada na região trans-ilíaca ou porção proximal do fêmur (figura 1B, 2). Punções trans-ilíacas reduzem o risco de lesões provocadas pelo deslizamento acidental da agulha pela crista ilíaca (RASKIN, 1998). MASSUMOTO et al. (1997) colheram M.O. do osso esternal e do íleo de pessoas e não relataram complicações decorrentes dessa técnica. No entanto, descreveram que a obtenção do volume de 10-15mL kg⁻¹ (de peso do paciente) de medula ocorreu somente após múltiplas perfurações.

Para cães obesos ou musculosos, a porção crânio-lateral da tuberosidade maior do úmero (figura 1C, 3G, 3H, 3I) é uma ótima opção para coleta de material (RASKIN, 1998; ZAMPROGNO, 2007). Os autores desta revisão sugerem também a epífise proximal da tíbia (figura 1D, 3A, 3B, 3C) como sendo uma região para obtenção de grande quantidade de medula óssea, assim como a porção proximal do fêmur e a tuberosidade maior do úmero, citadas anteriormente.

Técnicas de coleta

Para o procedimento de coleta em razão do exame cito-histopatológico ou da obtenção de células progenitoras da MO de cães, o animal deverá ser submetido à anestesia geral. O período pré-operatório deverá incluir jejum alimentar de 12 horas e restrição hídrica de seis horas, sendo realizada previamente a tricotomia do sítio de coleta (VAZ, 2006; CASTANIA, 2007; ZAMPROGNO, 2007; SALGADO, 2008). O paciente deve ser anestesiado e posicionado conforme o local escolhido para a coleta. Sugere-se o decúbito lateral (MENDONÇA et al., 2003; CASTANIA, 2007; ZAMPROGNO, 2007) se a coleta da medula óssea for realizada no osso femoral ou tibial, e o decúbito ventral se a escolha for a crista ilíaca (OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI et al., 2009). Entretanto, na prática dos autores, prefere-se o decúbito lateral, pois com esse posicionamento é possível acessar todos os locais anatômicos sugeridos anteriormente.

A precisão dos movimentos de introdução da agulha no canal medular pode determinar a rapidez e a precisão do procedimento, garantem os autores. Estes sugerem a seguir algumas manobras que promovem a eficiência do procedimento. A eficiente empunhadura da agulha depende do correto apoio na palme da mão, para que o cirurgião consiga aplicar melhor a sua força. O dedo indicador deve ser colocado na porção final da agulha, ou seja, a cerca de 4cm do bisel, e será o responsável, tanto pelo movimento de pivô da mão do cirurgião, direcionando a perfuração e introdução da agulha, quanto pela

limitação da introdução desta. Essa limitação é importante, pois assegura que somente a porção adiante do dedo seja introduzida. Esse artifício oferece certo grau de segurança ao procedimento, uma vez que limita eventuais perfurações indesejadas, caso haja deslizamento da agulha.

A outra mão será utilizada para apreender e delimitar as extremidades do local a ser perfurado, garantindo, assim, que a agulha seja introduzida na região desejada do osso. Para iniciar a perfuração, devem ser realizados movimentos de rotação com a mão (OLSSON et al., 2006), o pulso e o antebraço, simultaneamente, evitando a movimentação lateral da agulha. O cotovelo e o braço do cirurgião deverão permanecer imóveis, para garantir que o orifício de entrada da agulha seja o menor possível. Atenta-se ainda para que os movimentos de rotação sejam lentos e de grande amplitude, pois, assim, aproveita-se melhor a superfície de corte da extremidade do bisel.

Os autores deste artigo recomendam que todas as agulhas citadas anteriormente sejam utilizadas com um mandril em seu interior, concordando com LARUE et al., (2005), os quais sugerem tal procedimento quando for utilizada a agulha Jamshidi. Isso evita a obstrução da sua luz por esquirolas ósseas. Após a introdução e estabilização da agulha, o mandril deve ser removido, e uma seringa de 10mL contendo anticoagulante deve ser acoplada. Discreta retração do êmbolo é suficiente para obtenção de vácuo e aquisição do material desejado. A amostra coletada deve ser encaminhada ao laboratório em seringa previamente anticoagulada, em temperatura ambiente, ou ainda podem ser confeccionadas as lâminas, a partir de MO “in natura”, para serem analisadas tão logo obtidas (OLSSON et al., 2006).

Complicações

Algumas complicações eventualmente poderão ocorrer durante a coleta de medula óssea nos ossos longos, dentre elas, as fraturas (LAREU et al., 2005). Estas se tornam

iminentes quando são realizados movimentos de “alavanca” com a agulha, gerando força de separação dos fragmentos ósseos, conforme experiência dos autores desta revisão. Estes afirmam que essa situação é evitada toda vez que o cotovelo e o braço do cirurgião permanecem imóveis, deixando a rotação exclusivamente para a mão, o punho e o antebraço. Contudo, alertam que fraturas podem ocorrer quando são realizadas múltiplas perfurações em uma mesma região do osso. Isso é evitado quando as sessões de biópsia aspirativa são feitas em ossos distintos.

Em ossos da pelve, alguns acidentes importantes poderão ocorrer caso não haja o cuidado de delimitar a agulha com o dedo indicador, conforme sugerido anteriormente pelos autores. Essa região se apresenta como uma “caixa”, envolvendo as vísceras pélvicas (TARVIN & LENEHAN, 2005). Caso haja o deslizamento da agulha através do osso, como sugerido por RASKIN (1998), a extremidade cortante da agulha poderá ser projetada para o interior da pelve (figura 4A, 4B), perfurando uma víscera, como reto ou próstata, ou um grande vaso, provocando hemorragia local. Essa situação certamente é uma emergência, que poderia colocar em risco a vida do paciente.

Nas complicações desse procedimento, incluem-se os danos às estruturas de tecidos moles (LAREU et al., 2005) e a ausência de medula óssea durante a aspiração. Neste último caso, deve-se ter o cuidado de aspirar várias vezes o local puncionado com uma seringa de 10 ou 20mL, para que promova vácuo suficiente, antes de afirmar que a agulha não está no local correto. Permanecendo o insucesso de aspirado de MO, a perfuração poderá ter ultrapassado a cortical do osso (figura 4) e, assim, a abertura da agulha não estará no canal medular. Os autores desta revisão sugerem que, caso a suspeita seja esta, basta reintroduzir o mandril da agulha e recuá-la lentamente até que comece a refluir o sangue medular.

Existe ainda o risco de contaminação do canal medular, que pode evoluir para osteomielite. Cabe lembrar que, mesmo tratando-se de um pequeno orifício, este se

constitui numa porta de entrada de patógenos, sendo fundamental a realização de minuciosa antissepsia pré e pós-operatória (JUNIOR et al., 2008). Casos de osteomielite requerem cuidado minucioso de tratamento, sendo recomendada a realização de cultura e antibiograma do material obtido do foco infectado e, subsequentemente, uso de antibioticoterapia adequada para o paciente (RAHAL et al., 2003).

CONCLUSÕES

O avanço nas pesquisas com células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e mesenquimais (MSCs) da MO, em medicina veterinária, desperta a necessidade de aumentar os conhecimentos básicos a respeito de sua origem, sua aquisição e seu processamento. A medula óssea é uma fonte autóloga facilmente acessível de obtenção desse material e pode ser obtida dos ossos longos, como trocanter maior do fêmur e tuberosidade maior do úmero.

As complicações que podem surgir durante o procedimento de coleta de medula óssea são importantes. Contudo, cuidados como correta orientação da agulha e acurada técnica de introdução desta podem reduzir significativamente a ocorrência de lesões nos tecidos adjacentes ao foco de coleta.

REFERÊNCIAS

AQUINO, L.P.C.T. et al. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.1, p.8-18, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352002000100002&script=sci_arttext&tln_g=en>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0102-09352002000100002.

AZEVEDO, W.; RIBEIRO, M.C.C. Fontes de células-tronco hematopoiéticas para transplantes. In: SIMPÓSIO: TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA, 2000, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Ribeirão preto: USP, 2000. v.33, n.4, p.381-389.

BRUNELLI, A.T.J. et al. Transplante autólogo de células-tronco do limbo esclerocorneal em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.5, p.1194-1204, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352007000500015&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0102-09352007000500015.

BRUNO, B. et al. Purified canine CD34+Lin- marrow cells transduced with retroviral vectors give rise to long-term multilineage hematopoiesis. **Biology and Blood Marrow Transplantation**, Baltimore, v.7, n.10, p.543-551, 2001.

CASTANIA, V.A. **Enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena.** 2007. 67f. Tese (Doutorado em ortopedia. Traumatologia e reabilitação) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

CURY, P.M. Biópsia de medula óssea e sua interpretação – o papel do hematopatologista. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.2, n.25, p.79-80, 2003.

DOMINIS, M. et al. Bone marrow lymphoid aggregates in malignant lymphomas. **Croatian Medical Journal**, Zagreb, v.3, n.46, p.410-416, 2005.

EL-WARRAK, A.O.; SCHOSSLER, J.E.W. Osteossíntese diafisiária de tíbia em cães mediante inserção intramedular de pinos de steinmann pela crista tibial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.1, p.77-82 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384781998000100013&script=sci_arttext&tln>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-84781998000100013.

- FLEURY, S.A. **Biópsia de medula óssea (BMO) e sua relação com o aspirado de medula óssea (AMO)**. 2007. Acessado em 29 jul. 2008. Online. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/Publico/LaboratorioReferencia/ManualHematologia/pages/Bi%C3%B3psiademedula%C3%B3seaBMOesualela%C3%A7%C3%A3o.aspx>.
- GALE, R.P. et al. Aplastic anemia: biology and treatment. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.95, n.4, p.477-94, 1981.
- GOSSET, K.A. Anemias associated with drugs and chemicals. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. 2000. p.185-189.
- HANS, F.R.D. et al. Melhora sintomática e da capacidade de exercício após o transplante autólogo, transendocárdico, de células mononucleares da medula óssea em pacientes com cardiopatia isquêmica grave, sustentada até o sexto mês de evolução. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v.84, n.5, p.360-366, 2005.
- JAIN, N.C. Evaluation of anemias and polycythemias. In:_____. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap.8, p.159-168.
- JUNIOR, I.F. et al. **Punção e infusão intra-óssea**. Acessado em 29 jul. 2008. Online. Disponível em: www.uff.br/ph/artigos/intraossea.pdf
- LARUE, S.M. et al. Biópsia óssea. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 48, p.794-797.
- LOPES, R. et al. Avaliação do hemograma, reticulócitos e mielograma na intoxicação subaguda experimental por aflatoxina em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.2, p.257-262, 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84781998000200013&script=sci_arttext&tlng=en. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-84781998000200013.

LUND, J.E. Toxicologic effects on blood and bone marrow. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.44-50.

MASSUMOTO, C.M.S. et al. Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.43, n.2, p.93-98,1997. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0104423019970002000038&script=sci_arttext Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0104-42301997000200003.

MENDONÇA, C.L. et al. Avaliação clínica e hematológica em bezerros Nelore infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.23, n.2, p.52-60, 2003.

NAKAGE, A.P.M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.966-973, 2005. Disponível em: <<http://nsdl.org/resource/2200/20061003080541131T>>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782005000400040.

NAKAGE, A.M.; SANTANA, A.E. Células-tronco hematopoéticas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.325-329, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000100054>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782006000100054 .

OLIVEIRA, G.K. **Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão**. 2008. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

OLSSON, D.C. et al. Aspiração e quantificação da medula óssea em diferentes ossos para transplante de células-tronco mononucleares em cães. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO

EM MEDICINA VETERINÁRIA, 12., 2006, Lages, SC. **Anais...** Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina, 2006. V.12. 154p. p.109.

RAHAL, S.C. et al. Osteomyelitis associated with an orthopedic implant. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa Ontario, v.44, n.7, p.597-599, 2003

RASKIN, R. Medula óssea. In: SLATTER, D. **Manuel de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998. Cap.64, p.1135-1142.

SALGADO, V.R. Avaliação do cultivo microbiológico de aspirados de medula óssea e sangue no diagnóstico da brucelose canina. **Pubvet**, Botucatu, v.2, n.24, p.66-71, 2008.

SAMOTO, V.Y. **Terapia celular cardíaca: vias de infusão de células mononucleares em cães e gatos srd**. 2006. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

SILVA, R.L.; MACEDO, M.C.M.A. Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas sem uso de hemocomponentes. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.2, n.28, p.153-156, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842006000200018>.

Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S1516-84842006000200018.

SILVEIRA, C.D.; et al. Stem cell therapy for cardiology: a new path to humanity and a new care for nurses - a case report. **Online Brazilian Journal of Nursing** (OBJN-ISSN 1676-4285). Online, 2005 Abr. 4(1). Available in: www.uff.br/nepae/objn401silveiraetal.htm

SOBRINHO, A.H. et al. Hemograma, mielograma, coagulação sanguínea e teste do nbt na desnutrição infantil. **Pediatria**, São Paulo, v.1, p.243-248, 1979.

TARVIN, G.B.; LENEHAN, T.M. Tratamento dos deslocamentos sacroilíacos e das fraturas ilíacas. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. cap. 45, p.610-616.

TOGNOLI, G.K. et al. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.148-155, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008005000039&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008005000039.

VAZ, C.E.S. **Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fraturas: estudo experimental em coelhos**. 2006. 109f. Tese (Doutorado em Ortopedia e Traumatologia) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

WIJEWARDANA V. et al. Isolation and characterization of hematopoietic progenitor cells in canine bone marrow. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Ireland, v.15, n.3-4, p.230-238, 2007.

ZAMPROGNO, H. Células-tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.35, n.2, p.289-290, 2007.

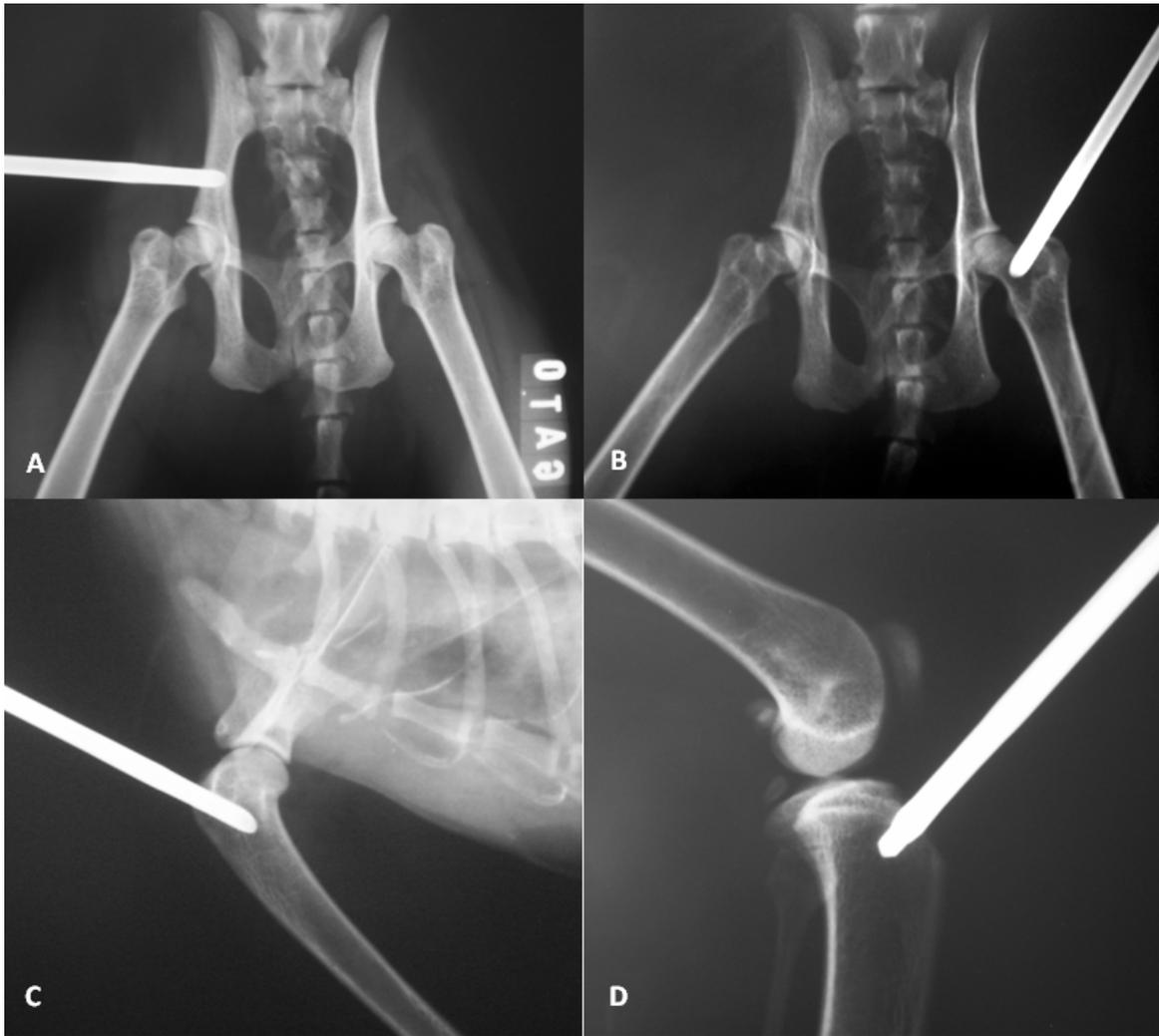


Figura 1 - Obtenção de medula óssea com agulha de Steis em felino. (A) Imagem radiográfica ventro-dorsal da agulha introduzida no corpo do íleo; (B) Imagem da ventro-dorsal da agulha no trocanter maior do fêmur; (C) Imagem radiográfica antero-posterior da agulha de Steis introduzida no tuberculo maior do úmero; (D) Imagem lateral da região epifisária proximal da tíbia. (Créditos: Daniel Curvello de Mendonça Müller)

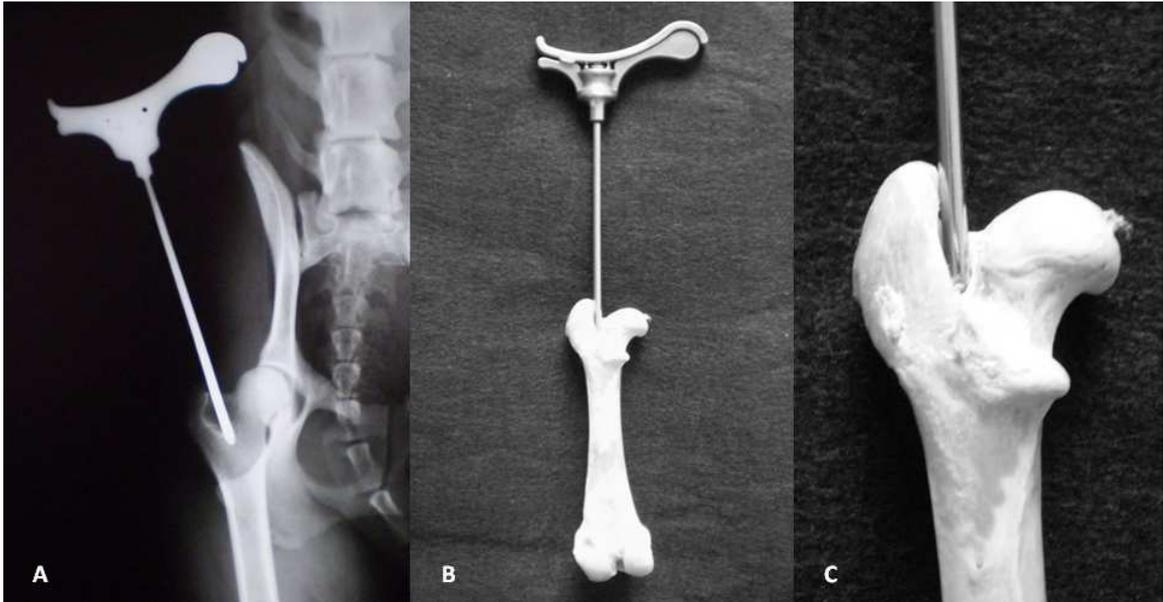


Figura 2 – Punção da fossa trocantérica de cão com agulhas Steis. (A) Imagem radiográfica ventro-dorsal; (B, C) Detalhes do local de introdução da agulha no osso. Observa-se que a extremidade da agulha é apoiada contra a face interna do trocanter maior do fêmur. (Créditos: Daniel Curvello de Mendonça Müller)



Figura 3 - Obtenção de medula óssea com agulha de Steis em canino. Imagem radiográfica latero-lateral (A) e frontal (B) da agulha na região epifisária proximal da tibia; (C) Detalhe do local de introdução da agulha na tibia demonstrado em peça anatômica; (D) Imagem radiográfica ventrodorsal da região pélvica com a agulha introduzida no corpo do ílio; (E, F) Demonstração em peça anatômica dos locais de introdução da agulha do corpo do ílio; (G) Imagem radiográfica anteroposterior do úmero, com a agulha introduzida no tubérculo maior do úmero. (H, I) Detalhes da agulha em peça anatômica. (Créditos: Daniel Curvello de Mendonça Müller)

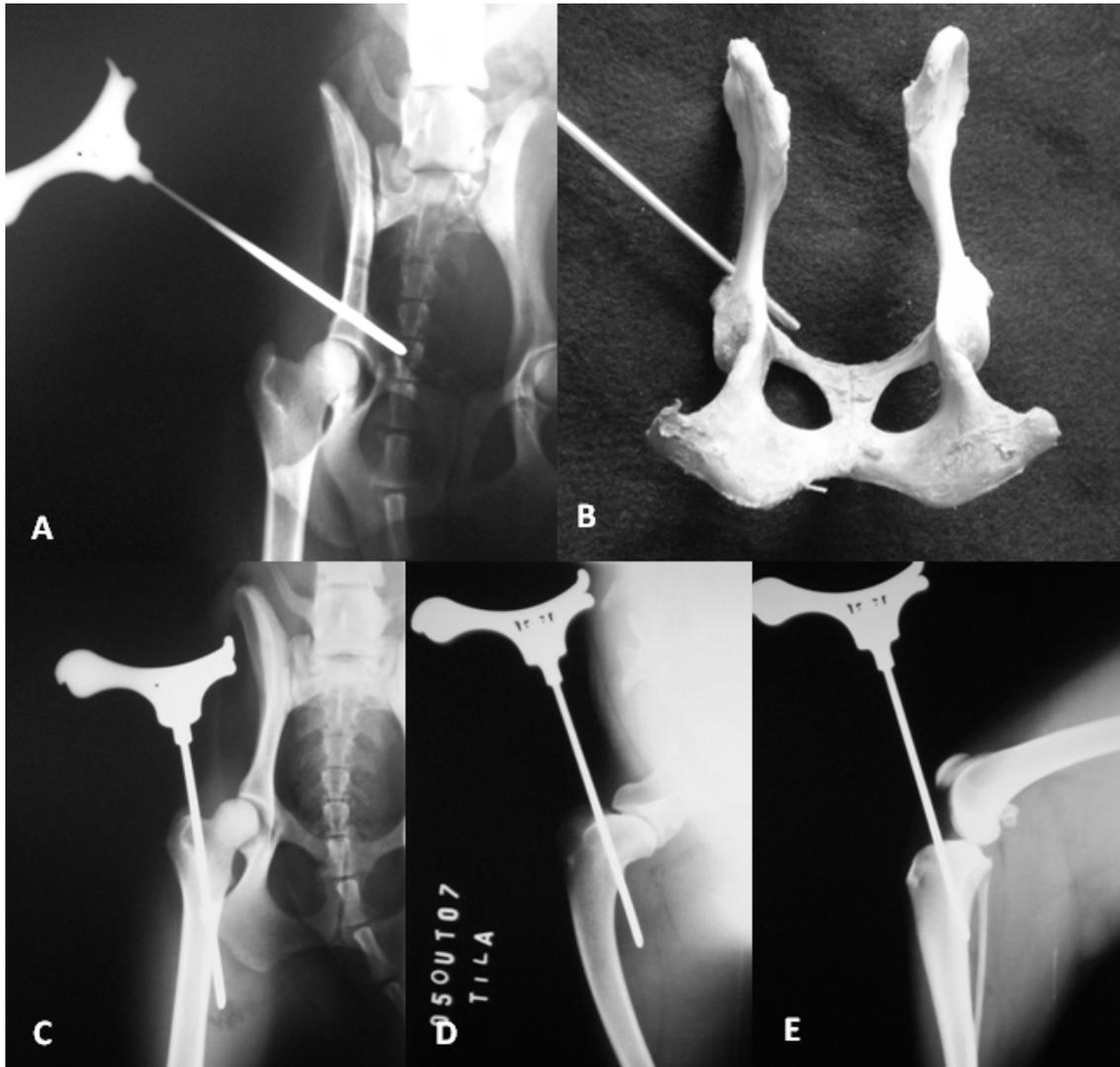


Figura 4 – Imagens radiográficas de complicações durante a coleta de medula óssea. (A) Imagem ântero-posterior da pelve, com a agulha de Steis transpassando o corpo do íleo e penetrando o interior da pelve. (B) Detalhe na peça anatômica, demonstrando a extremidade da agulha dentro da pelve e simulando as situações onde se transpassam as duas corticais do corpo do íleo. (C) Imagem ântero-posterior, demonstrando a agulha introduzida no trocanter maior do fêmur e emergindo na região medial da coxa. (D) Imagem da agulha transpassando o tubérculo maior do úmero. (E) Imagem radiográfica da agulha transpassando a cortical oposta da região proximal da tíbia. (Créditos: Daniel Curvello de Mendonça Müller)

5. CAPÍTULO 3

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**TRANSPLANTE INTRA-ARTICULAR DA FRAÇÃO TOTAL DE
CÉLULAS MONONUCLEARES EM CÃES SUBMETIDOS À
RECONSTRUÇÃO EXPERIMENTAL DE LIGAMENTO CRUZADO**

Daniel Curvello de Mendonça Müller, Ney Luis Pippi, Paula Cristina Basso, Eduardo de Bastos Santos Junior, Arícia Gomes Sprada, Luciele Varaschini Teixeira, Dominguita Lühers Graça, João Paulo da Cunha, Sônia Terezinha dos Anjos Lopes

CIÊNCIA RURAL, 2010

**TRANSPLANTE INTRA-ARTICULAR DA FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS
MONONUCLEARES EM CÃES SUBMETIDOS À RECONSTRUÇÃO
EXPERIMENTAL DE LIGAMENTO CRUZADO**

Daniel Curvello de Mendonça Müller^{8*} Ney Luis Pippi⁹ Paula Cristina Basso⁸ Eduardo
de Bastos Santos Junior⁸ Arícia Gomes Sprada¹⁰ Luciele Varaschini Teixeira¹¹
Dominguita Lühers Graça⁸ Sônia Terezinha dos Anjos Lopes⁹ João Paulo da Cunha⁸

-ARTIGO CIENTÍFICO-

RESUMO

Atualmente a medicina conta com promissores adjuvantes da cicatrização de tecidos, dentre eles as células-tronco. Este tratamento, também conhecido como medicina regenerativa, propõe o reparo ou a substituição de tecidos que sofreram lesão ou degeneração. Sabendo-se que a ruptura do ligamento cruzado (RLC) é a maior causa de afecção articular degenerativa do joelho, este trabalho teve por objetivo, avaliar a ação da fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea (FCMO) de aplicação intra-articular, após a correção cirúrgica do ligamento cruzado rompido. Foram utilizados 20 cães, os quais sofreram desmotomia do ligamento cruzado cranial e caudal unilaterais, 21 dias antes do reparo cirúrgico. Dez animais receberam as células autógenas no momento da correção. As avaliações se deram por estudo radiográfico, exames clínicos e biópsias aos 50 e 90 dias pós-operatórios. Concluiu-se que não houve diferença clínica entre os dois grupos até os 90 dias de avaliação. O grupo que recebeu a FCMO apresentou

⁸ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS. Rua Acadêmico Rigoberto Duarte, 70, ap 501. cep: 97060-030, NS. De Lourdes, Santa Maria-RS. e-mail: cmdaniel@terra.com.br

⁹ Departamento de Clínica de Pequenos Animais da UFSM, RS

¹⁰ Curso de Medicina Veterinária da UFSM, RS

¹¹ Programa de Residência em Medicina Veterinária do Hospital Veterinário Universitário da UFSM, RS.

crescimento ósseo intra-articular ao estudo radiográfico, contudo, os vinte animais apresentaram célula CD34 positivas em suas amostras biopsiadas, indicando haver presença de células-tronco em ambos os grupos.

Palavras-chave: Células-tronco adultas; articulação do joelho; desmotomia; cães

ABSTRACT

Today, medicine has promising adjuvant therapies to the healing of tissues and among them are the stem cells. This treatment, also known as regenerative medicine, proposes the repair or replacement of tissues damaged or degenerate. Considering that cruciate ligament rupture (RLC) is a major cause of degenerative joint disease of the knee, this study was performed to evaluate the action of the fraction of total mononuclear cells from the bone marrow (FCMO) applied intra-articularly after surgical repair of ruptured cruciate ligament. Twenty dogs were used which suffered iatrogenic rupture of the cranial and caudal cruciate ligament one-sided, 21 days before the correction. Ten animals received the FCMO at the time of correction. The assessments were done through X-ray and clinical examinations, and biopsies at 50 and 90 days postoperatively. It was concluded that there was no clinical difference between the two groups until 90 days of evaluation. The group that received FCMO grew intra-articular bone shown on the X-ray study. All twenty animals, however, presented cells marked with CD34 on their biopsy samples, indicating the presence of stem cells in both groups.

Key words: Adult stem cells, the knee joint, dogs

INTRODUÇÃO

A ruptura do ligamento cruzado (LC) é uma lesão diagnosticada em grande parte dos cães com problemas articulares e também é causa importante de afecção articular degenerativa do joelho (BRINKER et al., 1999). O tratamento divide opiniões entre ser

clínico ou cirúrgico, contudo alguns pesquisadores afirmam que não há técnica cirúrgica que estacione a progressão da afecção articular degenerativa. O que se espera, é que ocorra menor acometimento com a estabilização cirúrgica do que sem a intervenção (BRINKER et al., 1999).

A utilização de células-tronco da medula óssea (MO) de indivíduos adultos abriu um novo horizonte na medicina reparadora, pois não há possibilidade de rejeição imunológica (já que as células são autólogas) nem a necessidade de estoque de células em bancos de tecidos (já que o estoque aparentemente é inesgotável e ainda é possível expandí-las em cultura) (MOTA et al., 2005).

Estas células possuem capacidade de se diferenciar de acordo com o meio ambiente local e migram sempre atraídas por fatores da inflamação aguda (SOUZA et al., 2005). Nos últimos anos, a utilização de células-tronco através do transplante de MO, tem se tornado cada vez mais comum (GALLACHER et al., 2000; CUTLER & ANTIN, 2001).

Praticamente todas as vias de administração de células-tronco foram utilizadas experimentalmente e, até o momento, não há um consenso na literatura em relação a qual seria a melhor via, bem como não se sabe se haveria um número mínimo ou máximo de células a serem utilizadas (OTERO et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação das células mononucleares autógenas, aplicadas intra-articularmente, em pacientes submetidos à correção cirúrgica, intra-capsular, do ligamento cruzado, 21 dias após a desmotomia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 20 cães, machos e fêmeas, oriundos do biotério central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais passaram por um período de adaptação de 30 dias, mantidos em gaiolas individuais. Durante este período, todos foram

desverminados, tiveram o membro pélvico direito radiografado e foram avaliados hematologicamente para a confirmação de suas adequadas condições de saúde. Foram separados em dois grupos, sendo eles, um grupo controle (GC) e um grupo tratado (GT). Ambos os grupos foram subdivididos em dois períodos de biópsias, 50 (A) e 90 (B) dias. Os animais sofreram a desmotomia dos ligamentos cruzados cranial e caudal unilaterais, por artrotomia conforme MÜLLER et al. (2010), e 21 dias após a ruptura, todos foram tratados cirurgicamente pela técnica intra-capsular de MÜLLER et al. (2010). O GT, além do tratamento cirúrgico, recebeu a fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea, por aplicação intra-articular, ao término da correção cirúrgica.

Para tanto, cada animal do GT foi submetido ao procedimento de colheita de MO, duas horas antes da correção, em ambiente cirúrgico, com toda a paramentação necessária a fim de promover um procedimento asséptico. Utilizou-se como protocolo anestésico, maleato de acepromazina ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ via intramuscular) associado ao cloridrato de morfina ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ via intramuscular) como medicação pré-anestésica, seguida, após 15 minutos, de indução anestésica com propofol (4 mg kg^{-1} via intravenosa). A manutenção da anestesia se deu com isoflurano vaporizado em circuito semi-aberto com oxigênio. A oxacilina sódica (30 mg kg^{-1} via intravenosa) foi utilizada como profilaxia antimicrobiana, 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. O protocolo antiinflamatório e analgésico pós-operatório, seguiu os protocolos utilizados por MÜLLER et al. (2010).

A MO foi colhida, utilizando-se a agulha de Steis (11G X 3”), adotando como sítios de colheita, ambos os fêmures e os úmeros, seguindo a técnica proposta por MÜLLER et al. (2009). Colheu-se o volume total de MO de 10 ml kg^{-1} , conforme proposto por OLSSON et al. (2009), contudo optou-se por dividir esse volume aos quatro membros do animal, resultando em $2,5 \text{ ml kg}^{-1}$ de MO em cada. Para isso, foi necessária apenas uma perfuração óssea em cada osso.

O volume total de MO obtido, foi filtrado em linha de 850 μ m, 500 μ m e 200 μ m da bolsa de transplante de MO para remoção de espículas ósseas e êmbolos gordurosos. A solução resultante foi acondicionada em bolsa de transporte para envio imediato ao laboratório.

Os primeiros 3ml de medula colhidos diretamente do fêmur, foram enviados para realização de mielograma. Lâminas foram confeccionadas por esfregaço, para análise complementar da atividade hematopoiética e morfológica das células da MO. As lâminas foram coradas por *kit* panótico rápido, composto de um álcool fixador, um corante eosinofílico e outro basofílico e foram avaliadas de acordo com a relação mielóide e eritróide de normo, hipo ou hiper celular da MO por microscopia de luz.

A separação das células da MO seguiu o protocolo descrito por OLSSON et al. (2009), no qual, após a colheita, o volume foi centrifugado a 1600 rotações por minuto (rpm) (força centrípeta de 440 x g) em tubos Falcon de 50ml e isolado em gradiente de densidade Histopaque 1.077g ml⁻¹ (1:1), de acordo com a técnica de Boyum (BOYUM, 1968), mantendo-o a uma temperatura entre 18-26°C. O halo formado depois da centrifugação foi colhido entre as interfaces, lavados e centrifugados (5 minutos; 440 x g) três vezes em meio contendo solução salina 0,9%, DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle's Medium*) e soro sanguíneo autólogo estéril, com intuito de remover os agregados celulares, obtendo como produto final o botão celular, padronizado em 1000 μ l.

Uma pequena fração (50 μ l) de células mononucleares (CM) suspensas foi colhida para contagem manual da porcentagem e quantificação de CM. Testou-se a viabilidade celular (do botão celular) por método de exclusão com corante azul de Tripán 1% (MELO et al., 2003) em lâmina de Neubauer, sendo considerada aceitável uma viabilidade acima de 90% e um número mínimo de 2x10⁶kg⁻¹ de CM cm² (SUTER et al., 2004).

Simultaneamente à separação das células, procedeu-se a correção cirúrgica do ligamento cruzado. Para tanto, adotou-se a técnica intra-capsular de MÜLLER et al.

(2010), a qual utiliza implante sintético de polipropileno como substituto do ligamento cruzado cranial. Ao final do procedimento, uma agulha, tamanho 25x7, foi introduzida na região articular para a introdução das células. Cabe ressaltar, que o procedimento cirúrgico foi programado para encerrar simultaneamente ao término do processamento das células.

As avaliações constaram de estudo radiológico, análise do líquido sinovial colhido no momento das biópsias, avaliação clínica e microscópica do material colhido aos 50 e 90 dias pós-operatório, através dos métodos histoquímicos de Hematoxilina-eosina (H&E), Tricrômico de Masson e Von Kossa e imuno-histoquímica com marcação de CD34.

A avaliação radiográfica constou de duas projeções (antero-posterior e latero-lateral), nos momentos antes da ruptura do ligamento (articulação sadia) e antes da biópsia (máximo período de permanência do implante, antes da sua remoção). Avaliou-se o crescimento de qualquer estrutura intra-articular, adotando-se como critério, os graus: (0) Sem alteração da superfície articular; (1) Irregularidade da superfície articular; (2) Saliência da superfície articular com leve projeção radiopaca; (3) Saliência da superfície articular com acentuada projeção radiopaca.

Ao final do experimento, os 20 cães tiveram suas articulações reestabilizadas, com o mesmo implante sintético de polipropileno, e foram doados a pessoas interessadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A opção por obter-se a MO dos quatro membros do animal, baseou-se na afirmação de que o volume inicial colhido após a perfuração de um osso longo é, de fato, composto por MO. Entretanto, após “esgotar” a MO deste osso perfurado, inicia-se o refluxo de sangue periférico, devido ao íntimo contato da agulha com a artéria nutriente principal, localizada no espaço intramedular do osso (BRINKER et al., 1999). Desta forma, aumentando o número de ossos para coleta, aumentou-se também a quantidade efetiva de MO colhida. Como padronização da técnica, optou-se por colher um quarto do

volume total em cada um dos quatro sítios, sendo esses, o trocânter maior do fêmur e a cabeça do úmero (MÜLLER et al., 2009), bilaterais. Pode-se afirmar que, neste trabalho, obteve-se a MO com mais facilidade, quando os úmeros foram o sítio de colheita. Dos 20 úmeros perfurados, em 12 (60%), precisou-se apenas um movimento de sucção com a seringa para se obter o volume desejado, enquanto que no fêmur, isso não ocorreu em nenhum dos 20 sítios. Este dado torna-se importante, quando se pensa em velocidade do processo para se evitar a morte celular (OLSSON et al., 2009).

Baseado na pesquisa de OLSSON et al. (2009) a quantidade de MO colhida por animal foi de 10ml kg^{-1} e segundo PIZZO e POPLACK (2005), em humanos, esta é a quantidade de medula ideal a ser colhida para que um número adequado de células-tronco mononucleares (CTM) seja alcançado. GENGOZIAN (2000) indica como número ideal para a implantação (“pega”) do enxerto, o de 2×10^6 células, com pelo menos 90% de células viáveis. Obteve-se neste experimento, o número médio de $2,34 \times 10^6$ células μl^{-1} ($\pm 1,75$) com viabilidade média de 95,7% ($\pm 2,35$), o que se enquadra nos valores adequados para uma correta implantação.

Com relação ao local de administração da FCMO, mesmo não havendo um consenso sobre a melhor via (OTERO et al., 2009), estudos de STRAUER e KORNOWSKI (2003) e ANDERSON et al. (2005) demonstram ter sido encontrada maior quantidade de células quando estas foram administradas pela via intra-lesional. A partir desses dados, optou-se pela administração intra-articular das células, pois a via intravenosa, apesar de mais fácil execução, possui o efeito de primeira passagem pulmonar e a necessidade de várias passagens circulatórias até que as células entrem em contato com a lesão (STRAUER & KORNOWSKI, 2003). Este fato pode diminuir significativamente a quantidade de células no tecido alvo (STRAUER & KORNOWSKI, 2003).

Em todos os animais que apresentaram alguma alteração, essas foram oriundas dos orifícios ósseos por onde se passou o implante sintético. Dos 10 cães do grupo controle,

apenas um (10%) apresentou grau 1 de irregularidade sobre o orifício da tíbia, não havendo sinais compatíveis com crepitação, dor ou claudicação do membro.

Nos 10 animais do grupo tratado, as alterações foram mais evidentes. Um cão (10%) apresentou grau 1 de irregularidade e um (10%) apresentou grau 2. Nesses animais, não estiveram associadas dor à flexão, crepitação ou claudicação no momento das respectivas biópsias. Contudo, três cães (30%) apresentaram grau 3 de irregularidade, ou seja, saliência a partir do orifício ósseo, com acentuada projeção radiopaca intra-articular (Figura 1). Dois desses animais apresentaram dor discreta à flexão, permitindo que a articulação fosse manipulada, embora apresentando sinais de desconforto durante o exame. Todos os três apresentaram crepitação moderada, intermitente durante a flexão e extensão passivas, mas curiosamente, não apresentaram claudicação (PENHA et al., 2007). O fato de 50% dos animais do grupo tratado apresentarem algum crescimento intra-articular, pressupõe a ação das células-tronco reconhecendo a lesão óssea iatropatogênica como uma importante fonte a ser reparada. Contudo, esse crescimento desordenado para o interior da articulação não é desejável.

Sabe-se que fatores de crescimento influenciam quimiotaxia, diferenciação, proliferação e atividade cinética de células ósseas, e desta forma, regulam fisiologicamente a cicatrização do osso. Numerosos fatores de crescimento têm efeito estimulante sobre a cicatrização de um defeito ósseo, induzindo quimiotaxia, proliferação e diferenciação de osteoblastos e seus precursores (SARKARA et al., 2006). Neste estudo, o fator de estímulo para a diferenciação das células-tronco mononucleares em osteoblastos foi o próprio osso esponjoso trazido pelo implante, durante a passagem pelo orifício do fêmur (KRAUS E KIRKER-HEAD, 2006). Este material é comprovadamente uma substância osteoindutora, capaz de reparar lesões ósseas (GONÇALVES et al., 1998; FERRIGNO et al., 2007).

Todos os animais foram submetidos à biópsia ao final dos períodos de observação (50 ou 90 dias após a correção cirúrgica) e para tanto, realizou-se a artrotomia do joelho e a secção do implante com o bisturi. As incisões para remoção do fragmento foram realizadas o mais próximo possível do fêmur e da tíbia, permitindo uma avaliação de toda a porção do implante que manteve contato com o interior da articulação. Utilizaram-se quatro métodos para cada material biopsiado, sendo esses H&E, Tricrômico de Masson, Von Kossa e marcação das células CD34.

Ocorreu crescimento de tecido conjuntivo ao redor de todos os 20 implantes de polipropileno, o que permitiu considerar um reforço extra à resistência e durabilidade do ligamento sintético. À coloração de H&E, este tecido conjuntivo mostrou-se denso e maduro, apresentando-se intimamente entrelaçado à trama do implante.

Em três amostras, identificou-se presença de medula óssea funcional no material colhido, sendo esses animais, integrantes do GT, ou seja, grupo que recebeu células-tronco. Considerando que a técnica cirúrgica utilizada para a reconstrução do ligamento cruzado, perfurou tanto o fêmur quanto a tíbia do animal, pode-se supor que o contato da articulação com o osso esponjoso das epífises perfuradas, foi um estímulo muito forte para a diferenciação das células-tronco aplicadas no local.

Na imuno-histoquímica, marcou-se o antígeno de superfície CD34, com o objetivo de identificar as células-tronco mononucleares presentes no local da cirurgia. Para surpresa dos pesquisadores, todas as 20 amostras (100%) apresentaram células CD34+, demonstrando a presença de células-tronco hematopoiéticas no implante de todos os animais, e em quantidades semelhantes.

O fato de haver células CD34+ nos cães do GC pode ter duas explicações. A primeira é a quimiotaxia de células-tronco estocadas no organismo, para o local da lesão, chamada de “homing” (VERFAILLIE, 2002). Entretanto, suspeita-se que este achado pode ter outra explicação. O fato de ter havido extravasamento de MO para dentro da

articulação, permitiu o contato desta com o implante (trama de polipropileno em quatro camadas) e assim, a medula teria funcionado como fornecedora de células-tronco durante a formação do tecido conjuntivo. Este período se deu ao longo dos 50 ou 90 dias, explicando, inclusive, o número semelhante de células marcadas entre os grupos.

À coloração de Von Kossa, evidenciou-se presença de depósitos de cálcio em 16 amostras (80%), sendo elas 9 (45%) do GT e 7 (35%) do GC. O tecido ósseo teve, portanto, desenvolvimento e maturação normais. As fibras coradas pelo Tricromio de Masson eram de cor azul e vermelha, demonstrando que havia maturação normal do tecido fibroso.

Na análise do líquido sinovial foram verificadas alterações nos aspectos físico, químico e citológico. A coloração rosada, a turbidez e a baixa viscosidade foram evidenciadas em sete das 12 amostras analisadas visualmente. Estes resultados apontam para um possível processo inflamatório e/ou degenerativo, como citam DE BIASI et al. (2001).

A concentração protéica total no líquido manteve-se elevada em todas as amostras, com média de 4,5g/dL, comparado com valores normais variando entre 2,0 e 2,5g/dL (PERMAN, 1980; LIPOWITZ, 1985). De acordo com FERNANDEZ et al. (1983), os valores de proteína apresentam-se elevados em casos de artropatia inflamatória devido ao aumento da permeabilidade vascular.

Neste estudo, a contagem total de células nucleadas variou de 1000 a 4800/ μ L, com média de 1500 células/ μ L, sendo que este parâmetro em líquidos normais varia de 250 a 3000/ μ L (BRINKER et al., 1999). Na avaliação citológica diferencial foram visualizadas células mononucleares (macrófagos, monócitos, células mesoteliais, sinoviócitos, plasmócitos, linfócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos); a

porcentagem de mononucleares pode chegar a 100% e a de polimorfonucleares mantém-se próxima de zero (JOHNSON & JOHNSON, 1993).

Na contagem diferencial, uma amostra apresentou celularidade típica de doença inflamatória aguda, contendo 90% de neutrófilos segmentados. Entretanto, o restante das amostras manteve padrão crônico típico de processo degenerativo, com celularidade mononuclear variando de 65 a 100% e predominância de macrófagos e linfócitos (BENNETT et al., 1988; JOHNSON & JOHNSON, 1993; WILKINS, 1993). Outro aspecto observado foi reatividade de células mesoteliais, linfócitos e macrófagos, indicando reação articular degenerativa. De acordo com BENNETT et al. (1988) e JOHNSON & JOHNSON (1993), os dados encontrados na análise do líquido sinovial são compatíveis com processo degenerativo de natureza não inflamatória. Esta situação advém do fato de que o modelo experimental aqui utilizado fez uso de apenas um ligamento sintético para substituir os ligamentos cruzados cranial e caudal. Esta técnica é capaz de estabilizar funcionalmente a articulação, contudo MÜLLER et al. (2010) afirmam que algum grau de instabilidade permanecerá após a cirurgia, não impedindo a progressão da DAD.

CONCLUSÃO

Conclui-se que para o modelo experimental proposto, não se recomenda o uso da fração total de células mononucleares, pois estas podem atuar no reparo da lesão óssea e induzir crescimento ósseo intra-articular. Trabalhos experimentais com células-tronco devem evitar modelos cujo foco de lesão mantenha contato direto com a medula óssea, pois torna incerta a origem das células-tronco encontradas nas respectivas biópsias. Conclui-se ainda que apesar de não ter havido diferença clínica entre o grupo tratado e o grupo controle, a fração total de células mononucleares, de aplicação intra-articular, foi capaz de induzir o

crescimento de medula óssea funcional, junto ao implante, em 30% dos animais que a receberam.

COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê em Ética em Pesquisa com animais da Universidade Federal de Santa Maria, sob o nº 23081.003653/2008-59 e seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D. et al. Cell-based therapy for disc repair. **The Spine Journal**, v.5, p.297-303, 2005.
- BENNETT, D. et al. A reappraisal of anterior cruciate ligament disease in the dog. **Journal Small Animal Practice**, v. 29, n. 5, p. 275-297, 1988.
- BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. **Scand. Journal Clinical Laboratory Investigation Supplement**, v.97, p.7, 1968.
- BRINKER, W.O.; PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. São Paulo. Manole, cap.17, A articulação fêmoro-tíbio-patelar (joelho). p.480-537, 1999.
- CUTLER, C.; ANTIN, J. H. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. **Stem Cells**, Dayton, v.19, p.108-117, 2001.
- DE BIASI, F. et al. Alterações no líquido sinovial do joelho de cães com osteoartrite induzida pelo modelo Pond e Nuki. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 5, p. 563-567, Out., 2001.
- FERNANDEZ, F.R. et al. Synovial fluid analysis: Preparation of smears for cytologic examination of canine synovial fluid. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.19, p.727-734, 1983.

FERRIGNO, C. R. A. et al. Estudo comparativo entre as osteossínteses com placas e osteossínteses com placas associadas a enxertos de proteína morfogenética óssea (Gen-Tech) em fraturas distais de rádio-ulna em cães com menos de 6 quilos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p. 65-69, Fev., 2007.

GALLACHER, L. et al. Identification of novel circulating human embryonic blood stem cells. **Blood**, Washington, v.96, n.5, p.1740-1747, 2000.

GENGOZIAN, N. Identification and isotation of hematopoietic progenitors. In: FELDMAN, B.F. et al. **Scham's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap.16, p.91-96.

GONÇALVES, E.A.L. et al. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo** [online]. v.12, n.3. 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-06631998000300018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 de dezembro de 2007.

JOHNSON, J.M., JOHNSON, A.L. Cranial cruciate ligament rupture. Pathogenesis, dianosis and postoperative rehabilitation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 23, n. 4, p. 717-733, 1993.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 32, p. 232-242, Apr., 2006.

LIPOWITZ, A.J. Synovial fluid. In: NEWTON, C.D., NUNAMARKER, D.M. **Textbook of small animal orthopaedics**. Philadelphia: Lippincott, 1985. p.1015-1028.

MELO, D.F. et al. Viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano em diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados. **Acta Scientiarum Health Sciences**. Maringá, v. 25, n. 1, p.69-74, 2003.

MOTA, A. C. A., SOARES, M.P.B., SANTOS, R.R. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectiva do

hematologista. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São José do Rio Preto, v.27, n.2, p.126-132, 2005.

MÜLLER, D.C.M. et al. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.39, n.7, p.2243-2251, out, 2009

MÜLLER et al. Emprego de implante sintético – malha de polipropileno – para promover a estabilização articular, após desmotomia dos ligamentos cruzados em cães – proposição de técnica. **Ciência Rural**. Santa Maria, 2010. No prelo.

OLSSON, D.C. et al. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.39, n.1, p.141-147, 2009.

OTERO R.M. et al. Terapia celular no acidente vascular cerebral. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**. São Paulo, v.31, n.1, p.99-103, 2009.

PENHA, E.M. et al. Pós-operatório tardio da substituição do ligamento cruzado cranial no cão **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.59, n.5, p.1184-1193, 2007.

PERMAN, V. Synovial fluid. In: KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 3.ed. New York: Academic, 1980. p.749-83.

PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. **Principles and practice of pediatric oncology**. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005. 1780 p.

SARKARA, M. R. et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. **Biomaterials**, Guildford, v. 27, p. 1817–1823, Nov., 2006.

SOUZA, L.C.G., et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**. v.20, n.3. p.270-278, 2005.

STRAUER, B.E.; KORNOWSKI, R. Stem cell therapy in perspective. **Circulation**, v.107, p.929-934, fev. 2003.

SUTER, S.E. et al. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34+ cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.31-47, 2004.

VERFAILIE, C. M. Hematopoietic stem cells for transplantation. **Nature Immunology**, Boston, v.3, n.4, p.314-317, 2002.

WILKINS, R.J. Joint fluid analysis. In: BOJRAB, M.J. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.705-710.

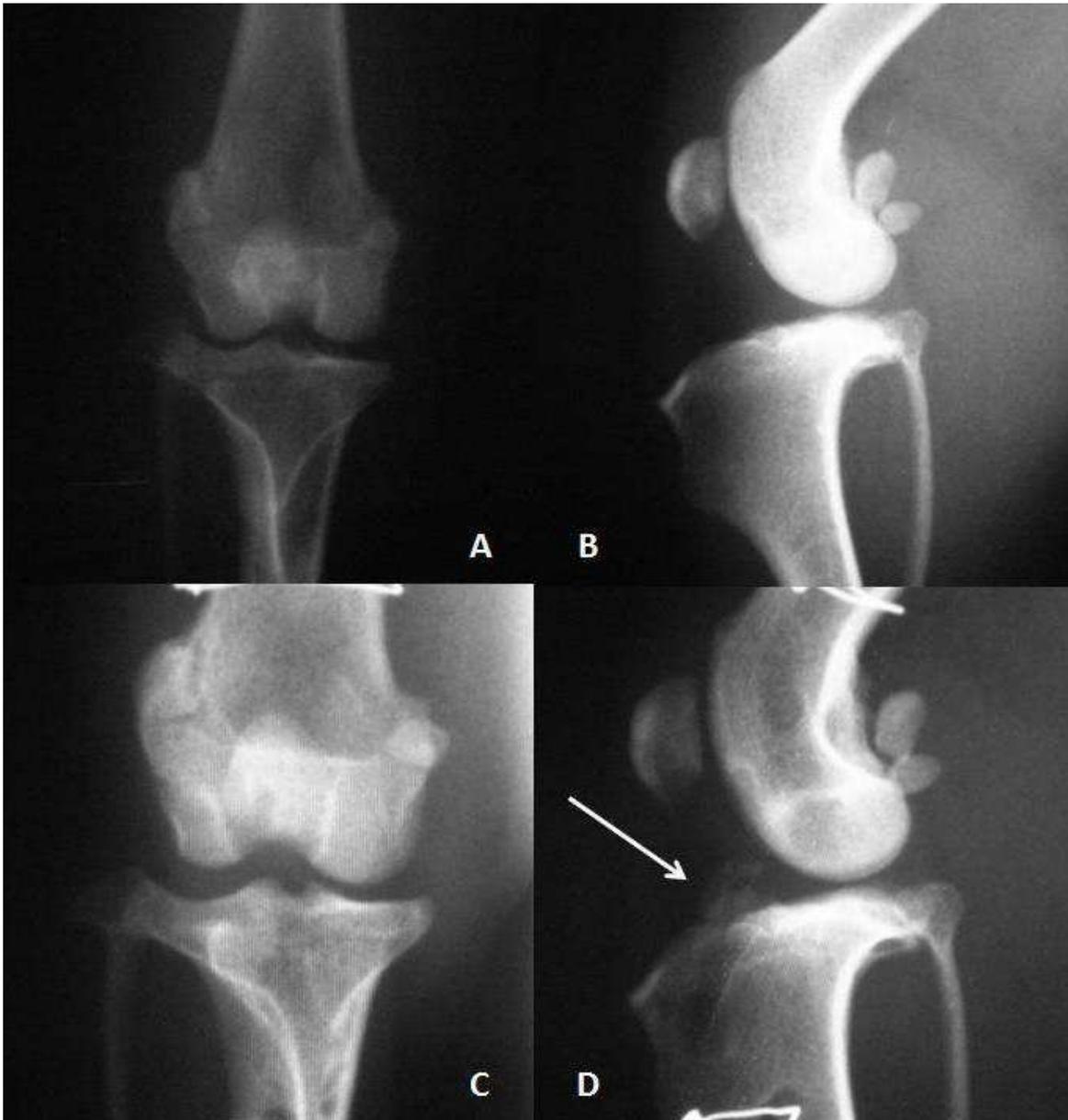


Figura 1 – Imagem radiográfica do membro posterior direito de um cão do grupo tratado. Em (A), observa-se a incidência crânio-caudal da articulação do joelho, após desmotomia do ligamento cruzado cranial e caudal, e em (B), a imagem da incidência latero-lateral no mesmo momento. As imagens (C) e (D), referem-se às mesmas incidências anteriores, porém, após 90 dias da correção cirúrgica com a técnica proposta. A seta branca da figura (D) demonstra o crescimento radiopaco ocorrido a partir do orifício da tíbia, sobre o trajeto do implante sintético. (Creditos: Daniel Curvello de Mendonça Müller)

6. DISCUSSÃO

A técnica proposta nesse trabalho para a correção dos ligamentos cruzados desmotomizados, mostrou-se de fácil execução, exigindo pouca dissecação da região operada e mínima utilização de instrumental especializado. Isso facilita a sua realização fora dos grandes centros cirúrgicos. O tempo médio de cirurgia foi de $55,8 \pm 8,34$ minutos, o que permitiria que todo o procedimento fosse realizado sob ação da anestesia epidural, diminuindo os riscos e os custos anestésicos.

Optou-se pela desmotomia tanto do ligamento cranial quanto do caudal, para avaliar a ação mecânica do implante de polipropileno como único estabilizador intra-articular do joelho. A correção foi realizada 21 dias após a ruptura, conforme preconizam SILVA & MUNIZ (1994). Esses autores informam que as cirurgias corretivas realizadas precocemente em suas rotinas foram as que apresentaram maior número de complicações pós-operatórias.

A opção por obter-se a MO dos quatro membros do animal, baseou-se na afirmação de que o volume inicial colhido após a perfuração de um osso longo é, de fato, composto por MO (BRINKER et al., 1999). Entretanto, após “esgotar” a MO deste osso perfurado, inicia-se o refluxo de sangue periférico, devido ao íntimo contato da agulha com a artéria nutriente principal, localizada no espaço intramedular do osso (BRINKER et al., 1999). Desta forma, aumentando o número de ossos para coleta, aumentou-se também a quantidade efetiva de MO colhida. Como padronização da técnica, optou-se por colher um quarto do volume total em cada um dos quatro sítios, sendo esses, o trocanter maior do fêmur e a cabeça do úmero (MÜLLER et al., 2009), de ambos os lados. Pode-se afirmar que, neste trabalho, obteve-se a MO com mais facilidade, quando os úmeros foram o sítio de colheita. Dos 20 úmeros perfurados, em 12 (60%), precisou-se apenas um movimento

de sucção com a seringa para se obter o volume desejado, enquanto que no fêmur, isso não ocorreu em nenhum dos 20 sítios. Este dado torna-se importante, quando se pensa em velocidade do processo para se evitar a morte celular (OLSSON et al. 2009).

Baseado na pesquisa de OLSSON et al. (2009) a quantidade de MO colhida por animal foi de 10ml kg^{-1} e segundo PIZZO e POPLACK (2005), em humanos, esta é a quantidade de medula ideal a ser colhida para que um número adequado de células-tronco mononucleares (CTM) seja alcançado. GENGOZIAN (2000) indica como número ideal para a implantação (“pega”) do enxerto, o de 2×10^6 células, com pelo menos 90% de células viáveis. Obteve-se neste experimento, o número médio de $2,34 \times 10^6$ células μl^{-1} ($\pm 1,75$) com viabilidade média de 95,7% ($\pm 2,35$), o que se enquadra nos valores adequados para uma correta implantação.

Com relação ao local de administração da FCMO, mesmo não havendo um consenso sobre a melhor via (OTERO et al., 2009), estudos de STRAUER e KORNOWSKI (2003) e ANDERSON et al. (2005) demonstram ter sido encontrada maior quantidade de células quando estas foram administradas pela via intra-lesional. A partir desses dados, optou-se pela administração intra-articular das células, pois a via intravenosa, apesar de mais fácil execução, possui o efeito de primeira passagem pulmonar e a necessidade de várias passagens circulatórias até que as células entrem em contato com a lesão (STRAUER & KORNOWSKI, 2003). Este fato pode diminuir significativamente a quantidade de células no tecido alvo (STRAUER & KORNOWSKI, 2003).

Quanto à técnica cirúrgica propriamente dita, pode-se destacar a forma de fixação do implante. No fêmur o implante foi fixado duas vezes, sem que houvesse excesso de material. Além disso, o fato da cerclagem ser fechada sobre o implante garantiu que quando este fosse dobrado (Figura 3B), o nó do fio de aço permanecesse protegido, evitando lesões aos tecidos adjacentes. A dupla fixação ao fêmur permitiu ainda que o implante fosse tracionado, sem risco de ruptura, para ser fixado à tíbia com a

hemicerclagem. O fato de a tíbia ser um osso triangular em sua diáfise proximal, fez com que se evitasse a realização da cerclagem completa ao redor do osso, pois além de instável nesta região, estrangularia uma grande porção muscular, conforme observado nos pré-experimentos. Optou-se pela fixação em “U”, sendo o fio de aço tracionado na porção medial do membro, acomodando-se o nó contra o osso. Não houve ruptura de nenhuma fixação, tanto no fêmur quanto na tíbia, durante o período de avaliação dos 20 animais operados.

Os problemas vinculados à utilização de enxertos nas técnicas intra-articulares ocorrem na fase de remodelamento, na qual o enxerto pode deformar ou afrouxar caso o pós-operatório não seja satisfatório (GAGLIARDO et al., 2004). Na busca de evitar complicações neste período, alguns cirurgiões optam pela imobilização do membro operado. PENHA et al. (2007), após utilizarem fásia lata autógena na correção do ligamento cruzado rompido, imobilizaram o membro no pós-operatório com muleta de Thomas modificada, durante 14 dias. Isso ocorreu em todos os pacientes, sendo que apenas um animal (7%) apresentou ruptura cinco semanas após o procedimento. SALBEGO et al. (2007), após substituírem o ligamento cruzado cranial de cães por segmento teno-ósseo homólogo conservado em glicerina a 98%, imobilizaram a articulação por quatro semanas, pelo método de transfixação percutânea (Ehmer-Kirschner). Esta imobilização garantiu a integridade de todos os implantes até o momento da biópsia, contudo resultou em um grau considerável de rigidez articular após a retirada do aparelho de fixação aos 30 dias de pós-operatório.

No experimento aqui relatado, não houve qualquer imobilização externa da articulação ao longo dos 90 dias de avaliação. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, contudo eram soltos em solário por duas vezes durante o dia, todos juntos, sem qualquer restrição da movimentação. O fato de não se imobilizar a articulação, facilita o cuidado pós-operatório, preservando-se a função da articulação, evitando aderências

intra-articulares e além de permitir que o próprio animal inicie o apoio do membro ao solo voluntariamente. Cabe ressaltar que a articulação livre, favorece também o trabalho do fisioterapeuta, o qual oferece importante suporte adjuvante ao tratamento desses pacientes (VEIGA et al., 2007).

A média do tempo de retorno ao apoio do membro ao solo foi de $8,85 \pm 4,43$ dias. Este dado refere-se ao início da utilização do membro, considerando os diferentes graus de claudicação, incluindo o apoio apenas quando em estação. Tal dado torna-se de extrema importância, considerando que segundo VEIGA et al. (2007), o trabalho de reabilitação deve priorizar a flexão e extensão articular para impedir a perda de amplitude do movimento. A utilização do membro ao caminhar é uma movimentação ativa e envolve movimentos de flexão e extensão, portanto, precocidade ao apoio é desejada e é sinônimo de reabilitação.

Dos 20 animais operados, dois (10%) apresentaram o implante rompido no momento da artrotomia e um (5%) apresentou o implante parcialmente rompido. Considerando que esses resultados partiram da situação onde somente um único implante substituiu os dois ligamentos (cranial e caudal), acredita-se que quando o material for empregado em associação ao ligamento caudal íntegro, apresentará uma estabilidade ainda maior. MENDENHALL et al. (1987) utilizaram prótese trançada de polipropileno em 17 cães, e tiveram como resultado ruptura parcial ou total de todos os implantes até os 10 meses. Atribuíram o insucesso à viscoelasticidade excessiva do dispositivo e a falha por fadiga. Ainda assim, cabe ressaltar que o implante utilizado na pesquisa aqui proposta, apresentou quatro camadas, diferente do utilizado por MENDENHALL et al. (1987). Além disso, têm-se o fato de que um único implante intra-articular neste experimento, demonstrou resultados clínicos altamente satisfatórios até os 90 dias.

Pelo mesmo motivo, foi observado movimento de gaveta discreto no membro operado de 17 animais e moderado nos três que apresentaram alterações físicas do

implante. Utilizou-se para a aferição do movimento articular, a comparação com o membro contralateral (sadio). Considerando o membro sadio com movimentação ausente, dividiram-se os escores em: ausente (sem movimentação), discreto (discreta movimentação cranial da tíbia em relação ao fêmur) e moderado (movimentação acentuada da tíbia), semelhante à avaliação de PENHA et al. (2007). Considerando que na ausência de ambos os ligamentos a articulação apresenta-se acentuadamente instável, percebeu-se que um único implante foi capaz de restaurar a dinâmica articular, com exceção dos três animais que apresentaram comprometimento do implante.

Na análise do líquido sinovial foram verificadas alterações nos aspectos físico, químico e citológico. A coloração rosada, a turbidez e a baixa viscosidade foram evidenciadas em sete das 12 amostras analisadas visualmente. Estes resultados apontam para um possível processo inflamatório e/ou degenerativo, como citam DE BIASI et al. (2001).

A concentração protéica total no líquido manteve-se elevada em todas as amostras, com média de 4,5g/dL, comparado com valores normais variando entre 2,0 e 2,5g/dL (PERMAN, 1980; LIPOWITZ, 1985). De acordo com FERNANDEZ et al. (1983), os valores de proteína apresentam-se elevados em casos de artropatia inflamatória devido ao aumento da permeabilidade vascular.

Neste estudo, a contagem total de células nucleadas variou de 1000 a 4800/ μ L, com média de 1500 células/ μ L, sendo que este parâmetro em líquidos normais varia de 250 a 3000/ μ L (BRINKER et al., 1999). Na avaliação citológica diferencial foram visualizadas células mononucleares (macrófagos, monócitos, células mesoteliais, sinoviócitos, plasmócitos, linfócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos), das quais a porcentagem de mononucleares pode chegar a 100% e a de polimorfonucleares mantém-se próxima de zero (JOHNSON e JOHNSON, 1993).

Na contagem diferencial, uma amostra apresentou celularidade típica de doença inflamatória aguda, contendo 90% de neutrófilos segmentados. Entretanto, o restante das amostras manteve padrão crônico típico de processo degenerativo, com celularidade mononuclear variando de 65 a 100% e predominância de macrófagos e linfócitos (BENNETT et al., 1988; JOHNSON e JOHNSON, 1993; WILKINS, 1993). Outro aspecto observado foi reatividade em células mesoteliais, linfócitos e macrófagos, indicando reação articular degenerativa. De acordo com BENNETT et al. (1988) e JOHNSON e JOHNSON (1993), os dados encontrados na análise do líquido sinovial são compatíveis com processo degenerativo de natureza não inflamatória. Esta situação advém do fato de que o modelo experimental aqui utilizado fez uso de apenas um ligamento sintético para substituir os ligamentos cruzados cranial e caudal. Esta técnica é capaz de estabilizar funcionalmente a articulação, contudo algum grau de instabilidade permanecerá após a cirurgia, não impedindo a progressão da DAD.

De 10 cães avaliados aos 50 dias após a cirurgia, um (10%) apresentava claudicação discreta durante a marcha e um (10%) apresentava claudicação constante ao caminhar. Dos 10 cães avaliados aos 90 dias, apenas um (10%) apresentava claudicação discreta durante a marcha. Esses três animais com alteração da marcha nos momentos das respectivas avaliações foram os mesmos que romperam parcial ou totalmente o implante. Os demais não apresentaram claudicação, apoiando completamente o membro durante a atividade física ou em estação. Esses resultados superam o tempo médio para o retorno funcional do membro operado, que varia em torno de quatro meses (ELKINS, 1991; MOORE E READ, 1996).

Ressalta-se aqui, que estatisticamente não foi observada diferença clínica entre o grupo controle e o grupo tratado e por isso, em alguns parâmetros, optou-se por comparar os animais quanto ao tempo de pós-operatório. As avaliações clínicas aconteceram antes da cirurgia, e aos 50 dias (grupo A) ou 90 dias (grupo B) após a correção cirúrgica.

Dezoito cães (90%) apresentaram ausência de dor, permitindo o exercício passivo de todos os movimentos fisiológicos da articulação sem apresentar relutância ao exame. Dois animais (10%) apresentaram dor discreta, permitindo que a articulação fosse manipulada embora apresentando sinais de desconforto articular, como voltar o focinho em direção ao avaliador durante o exame, sem vocalizar. Não se evidenciou qualquer sinal clínico de rejeição do implante utilizado, como produção acentuada de líquido sinovial, inflamação local ou perda da função articular.

A avaliação radiográfica constou de duas projeções (antero-posterior e latero-lateral), nos momentos antes da ruptura do ligamento (articulação sadia) e antes da biópsia (máximo período de permanência do implante, antes da sua remoção). Avaliou-se o crescimento de qualquer estrutura intra-articular, adotando-se como critério, os graus: (0) Sem alteração da superfície articular; (1) Irregularidade da superfície articular; (2) Saliência da superfície articular com leve projeção radiopaca; (3) Saliência da superfície articular com acentuada projeção radiopaca.

Todos os animais que apresentaram alguma alteração, tiveram como origem os orifícios ósseos por onde foi passado o implante sintético. Dos 10 cães do grupo controle, apenas um (10%) apresentou grau 1 de irregularidade sobre o orifício da tíbia, não havendo sinais compatíveis com crepitação, dor ou claudicação do membro.

Nos 10 animais tratados com as células-tronco, as alterações foram mais evidentes. Um cão (10%) apresentou grau 1 de irregularidade e um (10%) apresentou grau 2. Nesses animais, não estiveram associadas dor à flexão, crepitação ou claudicação no momento das respectivas biópsias. Contudo, três cães (30%) apresentaram grau 3 de irregularidade, ou seja, saliência a partir do orifício ósseo, com acentuada projeção radiopaca intra-articular. Dois desses animais apresentaram dor discreta à flexão, permitindo que a articulação fosse manipulada, embora apresentando sinais de desconforto durante o exame. Todos os três apresentaram crepitação moderada, intermitente durante a flexão e extensão passivas, mas

curiosamente, não apresentaram claudicação. (PENHA et al., 2007). O fato de 50% dos animais do grupo tratado apresentarem algum crescimento intra-articular, pressupõe a ação das células-tronco reconhecendo a lesão óssea iatrogênica como uma importante fonte à ser reparada, mesmo sendo indesejado na articulação.

Independente do grupo, dez cães (50%) não apresentaram qualquer sinal de crepitação articular, seis (30%) apresentaram crepitação discreta (presença de crepitação durante os extremos de flexão e extensão passivas) e quatro animais, (20%) crepitação moderada (crepitação intermitente durante a flexão e extensão passivas) de acordo com avaliação de PENHA et al. (2007). Acredita-se que a razão pela qual foi observada a crepitação nos animais deste trabalho, está no fato de existir algum grau de instabilidade articular, conforme CHIERICHETTI et al. (2001), além daqueles três citados anteriormente que apresentaram o implante comprometido.

Sabe-se que fatores de crescimento influenciam quimiotaxia, diferenciação, proliferação e atividade cinética de células ósseas, e desta forma, regulam fisiologicamente a cicatrização do osso. Numerosos fatores de crescimento têm efeito estimulante sobre a cicatrização de um defeito ósseo, induzindo quimiotaxia, proliferação e diferenciação de osteoblastos e seus precursores (SARKARA et al., 2006). Neste estudo, o fator de estímulo para a diferenciação das células-tronco mononucleares em osteoblastos foi o próprio osso esponjoso trazido pelo implante, durante a passagem pelo orifício do fêmur (KRAUS E KIRKER-HEAD, 2006). Este material é, comprovadamente, uma substância osteoindutora, capaz de reparar lesões ósseas (GONÇALVES et al., 1998; FERRIGNO et al., 2007).

Todos os animais foram submetidos à biópsia ao final dos períodos de observação (50 ou 90 dias após a correção cirúrgica) e para tanto, realizou-se a artrotomia do joelho e a secção do implante com o bisturi. As incisões para remoção do fragmento foram realizadas o mais próximo possível do fêmur e da tíbia, permitindo uma avaliação de toda

a porção do implante que manteve contato com o interior da articulação. Utilizaram-se quatro métodos para cada material biopsiado, sendo essas a H&E (Figura 1), Tricromio de Masson (Figura 2), Von Kossa (Figura 3) e marcação das células CD34 (Figura 4).

Ocorreu crescimento de tecido conjuntivo ao redor de todos os 20 implantes de polipropileno, o que permitiu considerar um reforço extra à resistência e durabilidade do ligamento sintético. À coloração de H&E, este tecido conjuntivo mostrou-se denso e maduro, apresentando-se intimamente entrelaçado à trama do implante (Figura 1).

Em três amostras, identificou-se presença de medula óssea ativa no material colhido (Figura 5), sendo esses animais, integrantes do GT, ou seja, grupo que recebeu células-tronco. Considerando que a técnica cirúrgica utilizada para a reconstrução do ligamento cruzado, perfurou tanto o fêmur quanto a tíbia do animal, pode-se supor que o contato da articulação com o osso esponjoso das epífises perfuradas, foi um estímulo muito forte para a diferenciação das células-tronco aplicadas no local.

Na imuno-histoquímica, marcou-se o antígeno de superfície CD34, com o objetivo de identificar as células-tronco mononucleares presentes no local da cirurgia. Para surpresa dos pesquisadores, todas as 20 amostras (100%) apresentaram células CD34+ (figura 4), demonstrando a presença de células-tronco hematopoiéticas no implante de todos os animais, e em quantidades semelhantes.

O fato de haver células CD34+ nos cães do GC pode ter duas explicações. A primeira é a quimiotaxia de células-tronco estocadas no organismo, para o local da lesão, chamada de “homing” (VERFAILLIE, 2002). Entretanto, suspeita-se que este achado pode ter outra explicação. O fato de ter havido extravasamento de MO para dentro da articulação, permitiu o contato desta com o implante (trama de polipropileno em quatro camadas) e assim, a medula teria funcionado como fornecedora de células hematopoiéticas durante a formação do tecido conjuntivo. Este período se deu ao longo dos 50 ou 90 dias, explicando, inclusive, o número semelhante de células marcadas entre os grupos.

À coloração de Von Kossa, evidenciou-se presença de depósitos de cálcio em 16 amostras (80%), sendo elas 9 (45%) do GT e 7 (35%) do GC. O tecido ósseo teve, portanto, desenvolvimento e maturação normais. As fibras coradas pelo Tricromio de Masson eram de cor azul e vermelha, demonstrando que havia maturação normal do tecido fibroso.

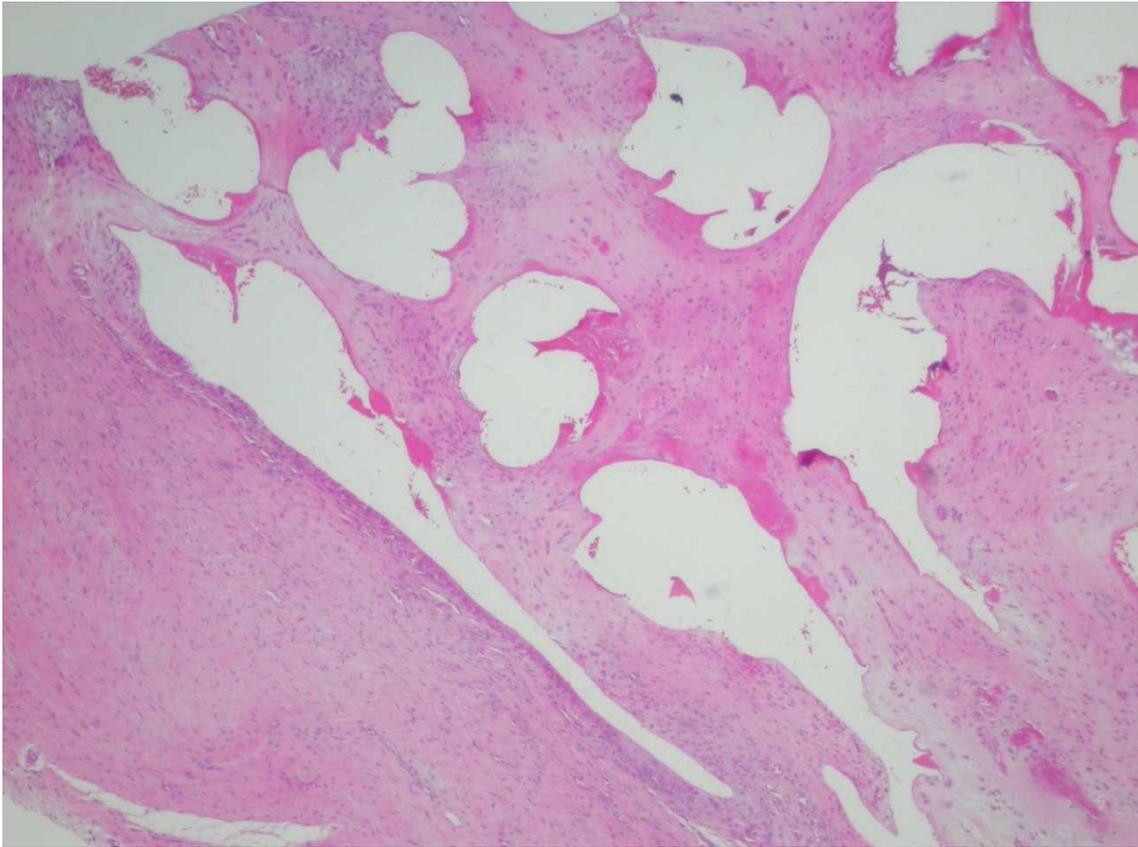


Figura 1 - (HE 40x) Tecido formado ao redor do implante sintético de polipropileno. Este tecido conjuntivo mostra-se denso e maduro, apresentando-se intimamente entrelaçado à trama do implante. Observam-se espaços vazios entre o tecido. Trata-se do local onde estava o implante. (Cão do grupo tratado. Biópsia aos 90 dias após a correção cirúrgica) (Créditos: Tatiana Mello de Souza)

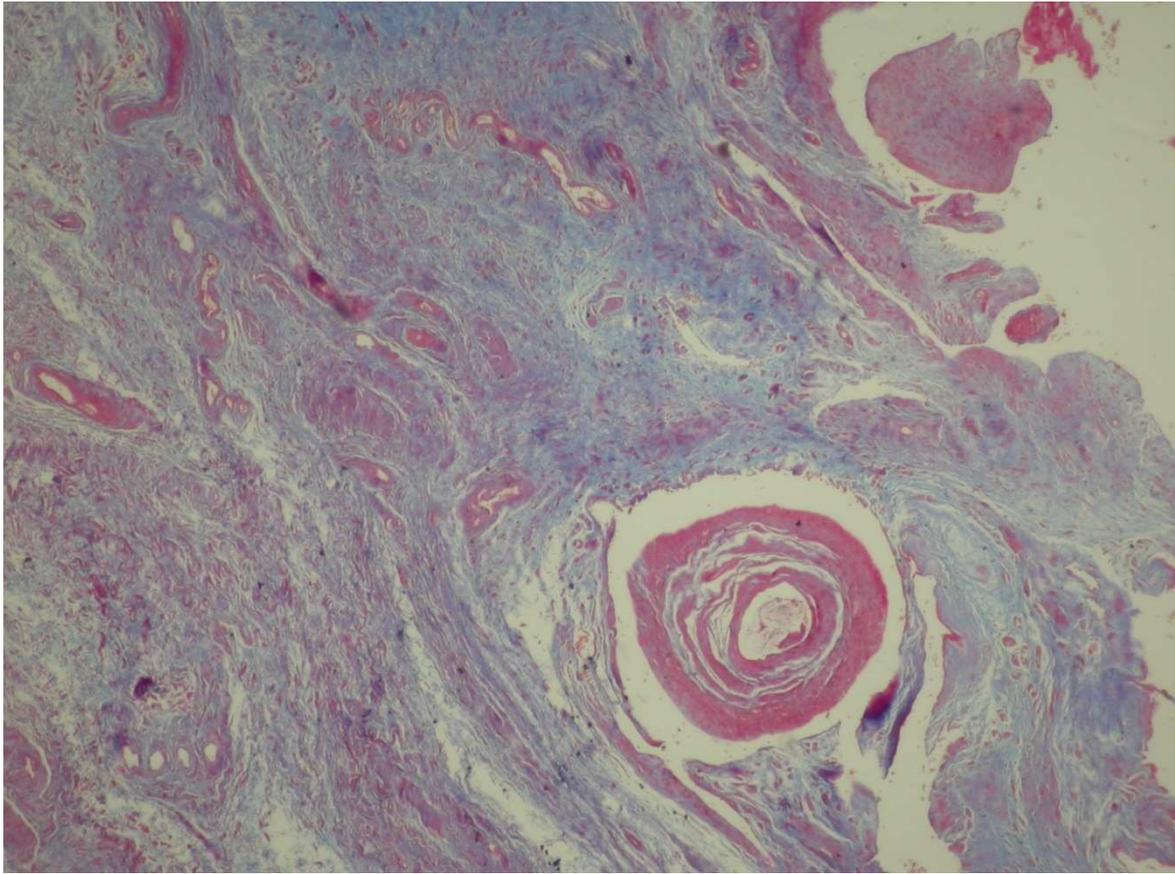


Figura 2 – (Tricromico de Masson 40x) Tecido ao redor do implante sintético de polipropileno. Observa-se presença de fibras colágenas azuis em ligeira predominância sobre as vermelhas. (Cão do grupo tratado. Biópsia aos 90 dias após a correção cirúrgica) (Créditos: Tatiana Mello de Souza)

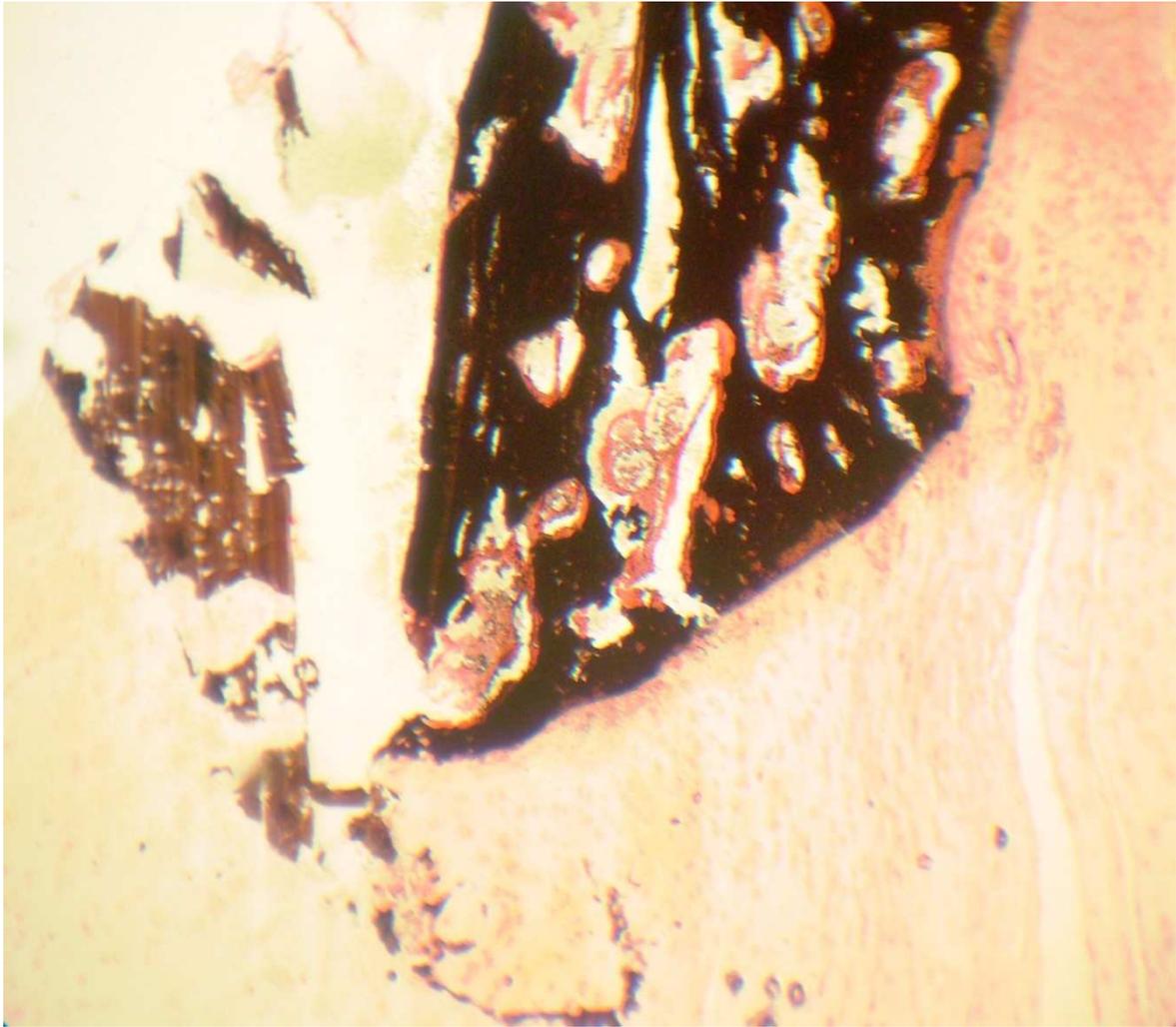


Figura 3 – (Von Kossa 40x) Tecido ao redor do implante sintético de polipropileno. Observa-se a placa de cálcio corada em preto, demonstrando o crescimento ósseo sobre o implante sintético. (Cão do grupo tratado. Biópsia aos 90 dias após a correção cirúrgica)

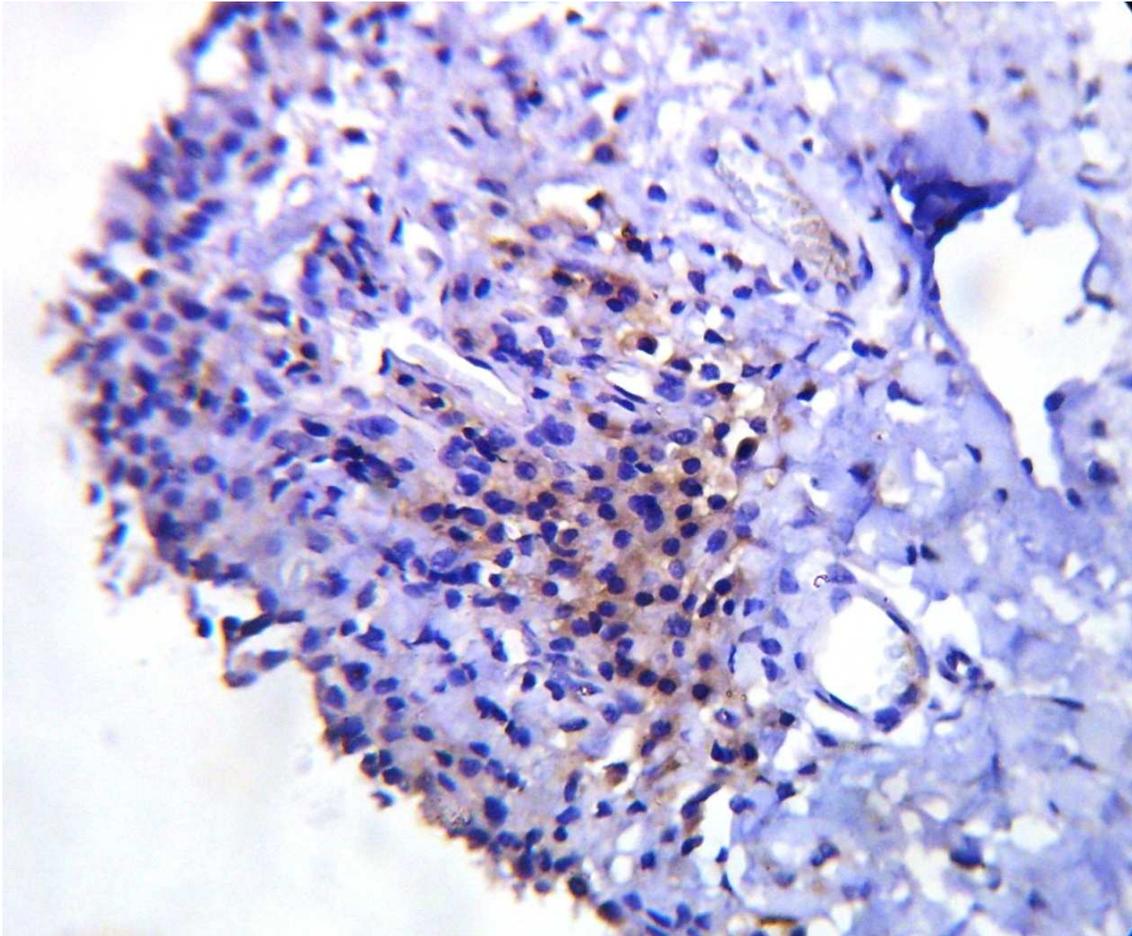


Figura 4 – (Imuno-histoquímica 100x) Observa-se a marcação dos antígenos de superfície CD34, com o objetivo de identificar as células-tronco hematopoiéticas. O conjunto de células amarronzadas situadas no centro da imagem são as células marcadas pela imunohistoquímica. (Cão do grupo controle. Biópsia aos 90 dias após a correção cirúrgica)

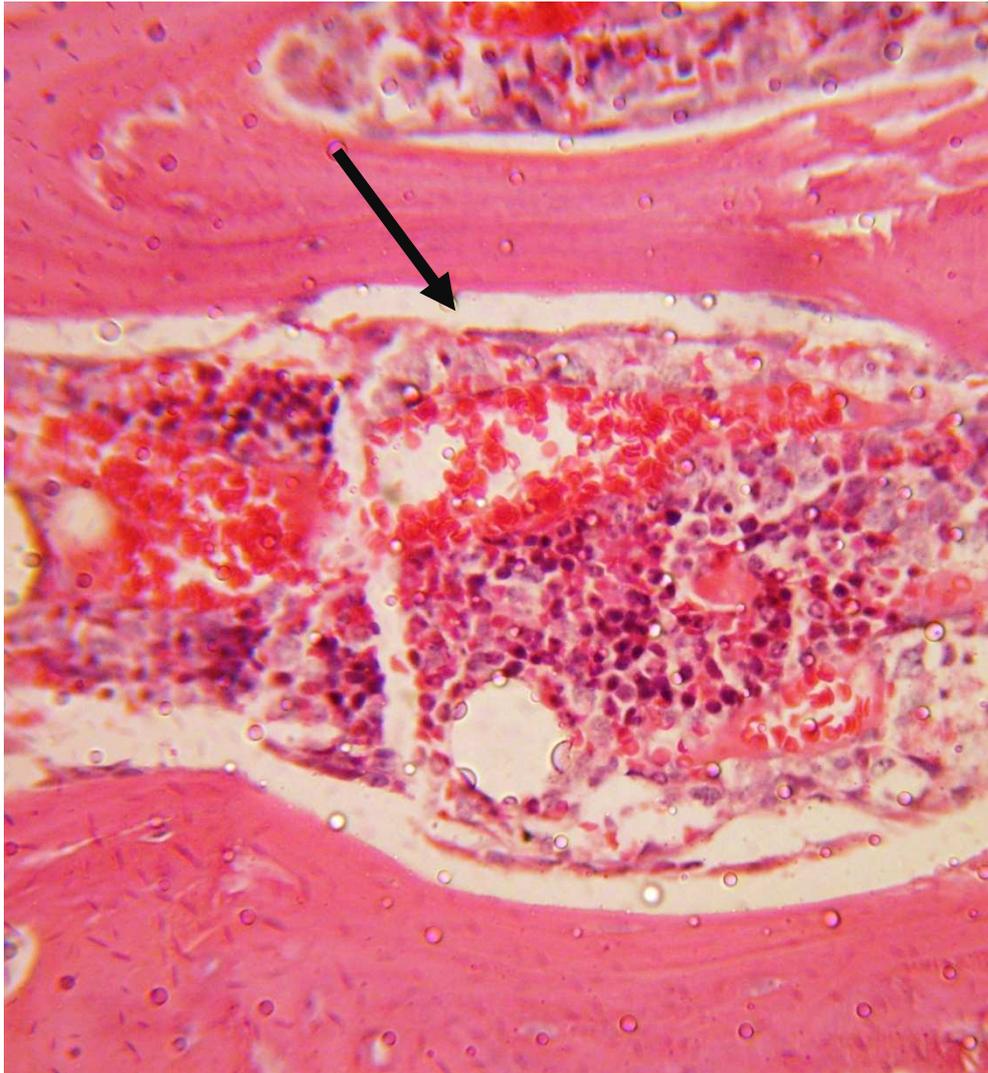


Figura 5 – (HE 100x) Lâmina demonstrando osso com presença de medula óssea funcional (seta) associada ao implante sintético de polipropileno. (Cão do grupo tratado. Biópsia aos 90 dias após a correção cirúrgica)

7. CONCLUSÕES

Após o desenvolvimento deste trabalho, foi possível concluir que:

- A malha de polipropileno, na forma como foi utilizada, é um material que oferece resistência adequada, para estabilizar parcialmente a articulação do joelho, na ausência dos ligamentos cruzados cranial e caudal.

- A técnica proposta exigiu pouca dissecação dos tecidos moles e permitiu total estabilidade na fixação do implante sintético ao osso.

- Utilizar um único implante sintético para substituir ambos os ligamentos cruzados (cranial e caudal), devolve a estabilidade articular e a função fisiológica do membro, mas não impede a permanência de um grau leve de movimento de gaveta e consequentemente a progressão da DAD.

- A medula óssea é uma fonte autóloga facilmente acessível de obtenção de células-tronco e pode ser adquirida do interior dos ossos longos, como a partir do trocanter maior do fêmur e tuberosidade maior do úmero.

- A correta orientação da agulha e acurada técnica de introdução da mesma podem reduzir significativamente a ocorrência de lesões aos tecidos adjacentes ao sítio, assim como algumas complicações.

- O modelo experimental da técnica cirúrgica proposta, não é recomendado para o uso da fração total de células mononucleares, pois estas podem atuar no reparo da lesão óssea e induzir crescimento ósseo intra-articular.

- Trabalhos experimentais com células-tronco devem evitar modelos cujo foco de lesão mantenha contato direto com a medula óssea, pois torna incerta a origem das células-tronco encontradas nas respectivas biópsias.

REFERÊNCIAS

- AMATUZZI, M. M.; ROSSI, J.D.M.B.A. **Patologia do joelho**. São Paulo: [s.n.], 1992. 187p, p.1,35,37,106–108.
- AMATUZZI, M.M. et al. O tratamento cirúrgico é imperativo na lesão do ligamento cruzado anterior? Há lugar para o tratamento conservador? **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.42, n.8, 2007.
- ANDERSON, D. et al. Cell-based therapy for disc repair. **The Spine Journal**, v.5, p.297-303, 2005.
- AQUINO, L.P.C.T. et al. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.1, p.8-18, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352002000100002&script=sci_arttext&tln_g=en>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0102-09352002000100002.
- ARIAS, S.A. et al. Avaliação radiológica e artroscópica e histologia da membrana sinovial do joelho de cães tratados com associação de sulfato de condroitina e hialuronato de sódio, após doença articular degenerativa induzida experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.55, n.4, 2003.
- AZEVEDO, W.; RIBEIRO, M.C.C. Fontes de células-tronco hematopoiéticas para transplantes. In: SIMPÓSIO: TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA, 2000, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Ribeirão preto: USP, 2000. v.33, n.4, p.381-389.
- BANWELL, M.N. et al. In Vitro Evaluation of the 18 and 36 kg Securos Cranial Cruciate Ligament Repair System. **Veterinary Surgery**. Philadelphia. v.34, n.3, p.283-288, 2005.
- BENNETT, D. et al. A reapraisal of anterior cruciate ligament disease in the dog. **Journal Small Animal Practice**, v. 29, n.5, p.275-297, 1988.

BENNETT, D.; MAY, C. Moléstias articulares de cães e gatos In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4ed. São Paulo: Manole, cap. 149. v.2, p.2817-2818, 1997.

BOSCHIN, L.C. et al. Artrotomia “versus” artroscopia: avaliação pós-operatória da reconstrução do ligamento cruzado anterior. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.37, n.1/2, 2002.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. **Scand. Journal Clinical Laboratory Investigation Supplement**, v.97, p.7, 1968.

BRENDOLAN, A.P. et al. Aspectos clínicos e radiográficos do pericárdio bovino como substituto do ligamento cruzado cranial de cães **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.59, n.4, 2007.

BRINKER, W.O.; PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. São Paulo. Manole, cap.17, A articulação fêmoro-tíbio-patelar (joelho). p.480-537, 1999.

BRUNELLI, A.T.J. et al. Transplante autógeno de células-tronco do limbo esclerocorneal em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.5, p.1194-1204, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352007000500015&script=sci_abstract&lng=pt. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0102-09352007000500015.

BRUNO, B. et al. Purified canine CD34+Lin- marrow cells transduced with retroviral vectors give rise to long-term multilineage hematopoiesis. **Biology and Blood Marrow Transplantation**, Baltimore, v.7, n.10, p.543-551, 2001.

CAFALLI, F. A. S.; BORELLI, V.; HOLZCHUH, M. P. et al. Estudo experimental dos efeitos da radiação laser de baixa energia na regeneração osteocartilagínea em joelhos de coelhos. **Rev Bras Ortop**. v.28, p.673-678, 1993.

CAMANHO, G.L.; VIEGAS, A.C. Avaliação de reconstrução do ligamento cruzado anterior em pacientes com idade acima de 45 anos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.36, n.1/2, 2001.

CAMARGO, O.P.A. et al. Lesão do ligamento cruzado posterior Incidência e tratamento. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.31, n.6, 1996.

CAMARGO, O.P.A. et al. Resultado a médio prazo da reconstrução da lesão crônica do ligamento cruzado anterior com prótese de poliéster. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.36, n.4, p.111-116, 2001.

CASTANIA, V.A. **Enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena**. 2007. 67f. Tese (Doutorado em ortopedia. Traumatologia e reabilitação) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

CHIERICHETTI, A.L.; ALVARENGA, J.; PEDRO, C.R. et al. Ruptura do ligamento cruzado cranial. estudo comparativo da técnica extra-articular com enxerto autógeno de fásia lata com e sem artrotomia exploratória. **Clínica Veterinária**. São Paulo, v.4, n.33, p.34-42, 2001.

COHEN, M. et al. Reconstrução intra-articular do ligamento cruzado anterior com enxerto autólogo de tendão patelar envolvido pelo ligamento sintético de poliéster. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.29, n.8, 1994.

CONZEMIUS, M.G. et al. Effect of surgical technique on limb function after surgery for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.226, n.2, p.232-236, 2005.

CURY, P.M. Biópsia de medula óssea e sua interpretação – o papel do hematopatologista. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.2, n.25, p.79-80, 2003.

CUTLER, C.; ANTIN, J. H. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. **Stem Cells**, Dayton, v.19, p.108-117, 2001.

DE BIASI, F. et al. Alterações no líquido sinovial do joelho de cães com osteoartrite induzida pelo modelo Pond e Nuki. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.53, n.5, 2001.

DOMINIS, M. et al. Bone marrow lymphoid aggregates in malignant lymphomas. **Croatian Medical Journal**, Zagreb, v.3, n.46, p.410-416, 2005.

DOVERSPIKE, M. et al. Contralateral cranial cruciate ligament rupture: incidence in 114 dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.29, p.167-170, 1993.

DUELAND, R.T. **Distúrbio Ortopédicos da Soldra**. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais. São Paulo: Editora Roca LTDA, p.11561163. 1998.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. O. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, cap.17, p.370, 1997.

ELKINS, D.A.; PECHMAN, R.; KEARNEY, M.T. et al. A retrospective study evaluating the degree of degenerative joint disease in the stifle joint of dogs following surgical repair of anterior cruciate ligament rupture. **Journal of the American Animal Hospital Association**. South Bend, v.27, p.533-540, 1991.

EL-WARRAK, A.O.; SCHOSSLER, J.E.W. Osteossíntese diafisiária de tíbia em cães mediante inserção intramedular de pinos de steinmann pela crista tibial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.1, p.77-82 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384781998000100013&script=sci_arttext&tln_g=>>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-84781998000100013.

FARAH, S. et al. Tratamento das lesões crônicas do ligamento cruzado anterior com prótese artificial de partes moles. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.32, n.11, 1997.

FAUSTINO, C.A.C. Reconstrução do ligamento cruzado posterior com os enxertos dos tendões dos músculos flexores do joelho. **Acta Ortopédica Brasileira**. São Paulo, v.11, n.2, p.95-101, 2003.

FAUSTINO, C.A.C. Técnica cirúrgica de reconstrução do ligamento cruzado posterior com uso de enxerto do tendão patelar. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.31, n.2, p.143-150, 1996.

FERNANDEZ, F.R. et al. Synovial fluid analysis: Preparation of smears for cytologic examination of canine synovial fluid. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.19, p.727-734, 1983.

FERRIGNO, C. R. A. et al. Estudo comparativo entre as osteossínteses com placas e osteossínteses com placas associadas a enxertos de proteína morfogenética óssea (Gen-Tech) em fraturas distais de rádio-ulna em cães com menos de 6 quilos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p. 65-69, 2007.

FLEURY, S.A. **Biópsia de medula óssea (BMO) e sua relação com o aspirado de medula óssea (AMO)**. 2007. Acessado em 29 jul. 2008. Online. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/Publico/LaboratorioReferencia/ManualHematologia/pages/Bi%C3%B3psiademedula%C3%B3sseaBMOesuarela%A7%C3%A3o.aspx>.

FOSSUM, T.W. Cranial cruciate ligament rupture. In: _____. **Small animal surgery**. 2.ed. St Louis : Mosby. 1997. cap.35, p.957-966.

FUCHS, R. Comparação da reconstrução do ligamento cruzado anterior com enxerto autólogo de “tendão patelar” com e sem reforço de ligamento sintético. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.30, n.5, 1995.

GAGLIARDO, K.M.; SPIRONELLI, D.B.; EIMANTAS, G.C. Métodos de tratamento para a ruptura completa do ligamento cruzado cranial em cães – revisão. **Arquivo Apadec**, Maringá, n.8, 2004 b.

GAGLIARDO, K.M.; SPIRONELLI, D.B.; EIMANTAS, G.C. Ruptura completa do ligamento cruzado cranial em cães. **Arq. Apadec**, Maringá, n.8, 2004 a.

GALE, R.P. et al. Aplastic anemia: biology and treatment. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.95, n.4, p.477-94, 1981.

GALLACHER, L. et al. Identification of novel circulating human embryonic blood stem cells. **Blood**, Washington, v.96, n.5, p.1740-1747, 2000.

GENGOZIAN, N. Identification and isotation of hematopoietic progenitors. In: FELDMAN, B.F. et al. **Scham's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap.16, p.91-96.

GOISSIS, G. et al. Malhas de polipropileno recobertas com colágeno polianiónico ou como dupla camada com poli(cloreto de vinila) para a reconstrução da parede abdominal. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**. Campinas, v.17, n.2, p.69-78, 2001.

GONÇALVES, E.A.L. et al. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo** [online]. v.12, n.3. 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010306631998000300018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 de dezembro de 2007.

GONÇALVES, G. et al. Effects of chondroitin sulfate and sodium hyaluronate on chondrocytes and extracellular matrix of articular cartilage in dogs with degenerative joint disease. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.60, n.1, p.93-102, 2008.

GOSSET, K.A. Anemias associated with drugs and chemicals. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. 2000. p.185-189.

GRIFFIN, D.W., VASSEUR, P.B. Synovial fluid analysis in dogs with cranial cruciate ligament rupture. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.28, n.3, p.277-281, 1992.

HANS, F.R.D. et al. Melhora sintomática e da capacidade de exercício após o transplante autólogo, transendocárdico, de células mononucleares da medula óssea em pacientes com cardiopatia isquêmica grave, sustentada até o sexto mês de evolução. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v.84, n.5, p.360-366, 2005.

HERNIGOU P.H. et al. Percutaneous autologous bone marrow grafting for nonunions – Influence of number and concentration of progenitor cells. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. Boston, v.87, p.1430-1437, 2005.

HOTH, J.H. et al. Polypropylene braid augmented and nonaugmented intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction. **American Journal of Sports Medicine**. Baltimore, v.13, n.5, p.321-336, 1985.

HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L. Tratamento da doença articular In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 1º ed. São Paulo : Roca, cap.30, p.1058- 1070, 2002.

IAMAGUTI, P.; TEIXEIRA, R.B.; PADOVANI, C.F. Ruptura do ligamento cruzado em cães. Estudo retrospectivo da reconstituição com fáschia lata. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.34, n.2, p.131-138, 1998.

JAIN, N.C. Evaluation of anemias and polycythemias. In:_____. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap.8, p.159-168.

JOHNSON, J.M., JOHNSON, A.L. Cranial cruciate ligament rupture. Pathogenesis, dianosis and postoperative rehabilitation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.23, n.4, p.717-733, 1993.

JUNIOR, I.F. et al. **Punção e infusão intra-óssea**. Acessado em 29 jul. 2008. Online. Disponível em: www.uff.br/ph/artigos/intraossea.pdf

KOKRON, A.E.V. et al. A Isometricidade do Ligamento Cruzado Posterior. **Acta Ortopédica Brasileira**. São Paulo, v.9, n.2, 2001.

KOKRON, A.E.V. et al. Seria o ligamento cruzado posterior o principal estabilizador do joelho? **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.28, n.6, 1993.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 32, p. 232-242, Apr., 2006.

LARUE, S.M. et al. Biópsia óssea. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. cap.48, p.794-797.

LIANG, L.; BICKENBACH, J. R. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. **Stem Cells**, Dayton, v.20, p.21-31, 2002.

LIPOWITZ, A.J. Synovial fluid. In: NEWTON, C.D., NUNAMARKER, D.M. **Textbook of small animal orthopaedics**. Philadelphia: Lippincott, 1985. p.1015-1028.

LOPES, R. et al. Avaliação do hemograma, reticulócitos e mielograma na intoxicação subaguda experimental por aflatoxina em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.2, p.257-262, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84781998000200013&script=sci_arttext&tlng=en>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-84781998000200013.

LUND, J.E. Toxicologic effects on blood and bone marrow. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.44-50.

MASSUMOTO, C.M.S. et al. Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.43, n.2, p.93-98,1997. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0104423019970002000038&script=sci_arttext>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0104-42301997000200003.

MELO, D.F. et al. Viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano em diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados. **Acta Scientiarum Health Sciences**. Maringá, v.25, n.1, p.69-74, 2003.

MENDENHALL, H.V. et al. Evaluation of the polypropylene brain as a prosthetic anterior cruciate ligament replacement in the dog. **American Journal of Sports Medicine**, Baltimore, v.5, n.6, p.543-546, 1987.

MENDONÇA, C.L. et al. Avaliação clínica e hematológica em bezerros Nelore infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.23, n.2, p.52-60, 2003.

MILLER III, R.H. **Lesões do joelho**. In: CANALE, S.T. Cirurgia ortopédica de Campbell. 10.ed. Barueri: Manole, v.3, cap.43, p.2165-2338, 2007

MOORE, K.W.; READ, R.A. Rupture of the cranial cruciate ligament in dogs - part I. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. Auburn, v.18, n.3, p.223-234, 1996.

MOTA, A. C. A., SOARES, M.P.B., SANTOS, R.R. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectiva do hematologista. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São José do Rio Preto, v.27, n.2, p.126-132, 2005.

MÜLLER et al. Emprego de implante sintético – malha de polipropileno – para promover a estabilização articular, após desmotomia dos ligamentos cruzados em cães – proposição de técnica. **Ciência Rural**. Santa Maria, 2010. No prelo.

MÜLLER, D.C.M. et al. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.39, n.7, p.2243-2251, out, 2009

MÜLLER, D.C.M.; SCHOSSLER, J.E.W; PINHEIRO, M. Adaptação do índice de massa corporal humano para cães. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, n.4, p.1038-1043, 2008.

MUZZI L.A.L. et al. Fisioterapia após substituição artroscópica do ligamento cruzado cranial em cães. I - avaliação clínica, radiográfica e ultrassonográfica **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte. v.61, n.4, p.805-814, 2009

MUZZI, L.A.L. et al. Ruptura do ligament cruzado cranial em cães: fisiopatologia e diagnóstico. **Clínica Veterinária**. São Paulo, v.5, n.46, p.32-42, 2003.

NAKAGE, A.M.; SANTANA, A.E. Células-tronco hematopoéticas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.325-329, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000100054>.

Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782006000100054 .

NAKAGE, A.P.M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.966-973, 2005. Disponível em: <<http://nsdl.org/resource/2200/20061003080541131T>>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782005000400040.

NARDI, N. B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasília, v.37, n.6, p.490-495, 2004.

OLIVEIRA, G. K. **Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão**. 2008. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

OLIVEIRA, S.T. et al. Reparação do ligamento cruzado cranial de cães por tendão homólogo conservado em glicerina e associado a fio de náilon. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.33, n.4, p.717-723, 2003.

OLSSON, D.C. et al. Aspiração e quantificação da medula óssea em diferentes ossos para transplante de células-tronco mononucleares em cães. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA, 12., 2006, Lages, SC. **Anais...** Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina, 2006. v.12. 154p. p.109.

OLSSON, D.C. et al. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.39, n.1, p.141-147, 2009.

OTERO R.M. et al. Terapia celular no acidente vascular cerebral. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**. São Paulo, v.31, n.1, p.99-103, 2009.

PENHA, E.M. et al. Pós-operatório tardio da substituição do ligamento cruzado cranial no cão **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.59, n.5, p.1184-1193, 2007.

PEREIRA, P.P. et al. A integração do tendão do músculo semitendinoso como substituto do ligamento cruzado anterior – estudo experimental em coelhos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.30, n.11/12, 2000.

PERMAN, V. Synovial fluid. In: KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 3.ed. New York: Academic, 1980. p.749-83.

PIEIDADE, S.R.; MISCHAN, M.M. Tratamento cirúrgico da fratura-avulsão da inserção tibial do L.C.P. do joelho: experiência de 21 casos. **Acta ortopédica brasileira**. São Paulo, v.15, n.5, 2007.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. A articulação fêmur-tíbio-patelar **Manual de ortopedia e tratamento dos pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, cap.17, p.496-512, 1999.

PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. **Principles and practice of pediatric oncology**. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005. 1780 p.

PRIDIE, K. H. A method of resurfacing osteoarthritis knee joints. **J Bone Joint Surg**. v. 41, p. 618-619, 1959.

RAHAL, S.C. et al. Osteomyelitis associated with an orthopedic implant. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa Ontario, v.44, n.7, p.597-599, 2003

RASKIN, R. Medula óssea. In: SLATTER, D. **Manuel de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998. Cap.64, p.1135-1142.

ROCKWOOD JR., C. A.; GREN, D. P.; BUCHOLZ, R. W. **Fraturas em adultos**. ed. 3. São Paulo: Manole Ltda, p. 1831-1852, 1994.

SALBEGO, F.Z. et al. Substituição do ligamento cruzado cranial por segmento teno-ósseo homólogo conservado em glicerina a 98%. Estudo experimental em cães. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.37, n.2, p.438-442, 2007.

SALGADO, V.R. Avaliação do cultivo microbiológico de aspirados de medula óssea e sangue no diagnóstico da brucelose canina. **Pubvet**, Botucatu, v.2, n.24, p.66-71, 2008.

SAMOTO, V.Y. **Terapia celular cardíaca: vias de infusão de células mononucleares em cães e gatos srd**. 2006. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

SARAIVA, R.C.C. et al. Diagnóstico da lesão do ligamento cruzado anterior por tomografia computadorizada de duplo contraste com comprovação artroscópica **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.34, n.4, 1999.

SARKARA, M. R. et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. **Biomaterials**, Guildford, v.27, p.1817–1823, 2006.

SCHULZ, K., STIFLE. **Cranial cruciate ligament rupture**. In: FOSSUM, T.W. Manual of small animal surgery. 3ed. St. Louis: Mosby, cap.33, p.1254-1275, 2007.

SILVA, C.H.B.; MUNIZ, R.C. O uso do ligamento sintético nas lesões ligamentares agudas graves do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.29, n.5, p.299-302, 1994.

SILVA, R.L.; MACEDO, M.C.M.A. Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas sem uso de hemocomponentes. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.2, n.28, p.153-156, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842006000200018>.

Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S1516-84842006000200018.

- SILVEIRA, C.D.; et al. Stem cell therapy for cardiology: a new path to humanity and a new care for nurses - a case report. **Online Brazilian Journal of Nursing** (OBJN-ISSN 1676-4285). Online, 2005 Abr. 4(1). Available in: www.uff.br/nepae/objn401silveiraetal.htm. Acesso em: 8 mar. 2009.
- SILVEIRA, P. A. Hematopoiese: alguns aspectos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v.22, p.5-6, 2000.
- SNIDER, R. K. **Tratamento das doenças do sistema musculoesquelético**. ed. 1. São Paulo: Manole Ltda, p.311–321, 2000.
- SOBRINHO, A.H. et al. Hemograma, mielograma, coagulação sanguínea e teste do nbt na desnutrição infantil. **Pediatria**, São Paulo, v.1, p.243-248, 1979.
- SOUZA, L.C.G., et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**. v.20, n.3, p.270-278, 2005.
- STRAUER, B.E.; KORNOWSKI, R. Stem cell therapy in perspective. **Circulation**, v.107, p.929-934, fev. 2003.
- SUTER, S.E. et al. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34+ cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.31-47, 2004.
- TARVIN, G.B.; LENEHAN, T.M. Tratamento dos deslocamentos sacroilíacos e das fraturas ilíacas. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. cap. 45, p.610-616.
- TATARUMAS, A.C. et al. Sinovite linfocítica plasmocítica associada à rutura de ligamento cruzado cranial em um cão. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.36, n.1, p.303-306, 2006.
- TOGNOLI, G. K. Autotransplante da fração mononuclear da medula óssea em úlcera corneana por hidróxido de sódio experimental em cães. 2008. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

TOGNOLI, G.K. et al. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.148-155, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008005000039&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em 8 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008005000039.

TOMLINSON, J. Traditional repair techniques for the cranial cruciate deficient stifle. In: **World Small Animal Veterinary, Association**, World Congress – Vancouver, 2001- Proceedings.

VASSEUR, P.B. **Articulação do joelho**. In: SLATTER, D. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. São Paulo: Manole, p.2156-2185, 1998.

VAZ, C.E.S. **Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fraturas: estudo experimental em coelhos**. 2006. 109f. Tese (Doutorado em Ortopedia e Traumatologia) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

VEIGA, P.H.A. et al. Correlação entre a análise histológica e avaliação funcional do joelho de pacientes submetidos à reconstrução do ligamento cruzado anterior. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. São Carlos, v.11, n.4, p.253-260, 2007.

VERFAILIE, C. M. Hematopoietic stem cells for transplantation. **Nature Immunology**, Boston, v.3, n.4, p.314-317, 2002.

WANG, J. A.; FAN, Y. Q.; LI, C. L. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into damaged rabbit heart to improve heart function. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**. Hangzhou, v.6, n.4, p.42-248, 2005.

WARZEE, C.C, et al. Effect of the tibial plateau leveling on cranial and caudal tibial thrust in canine cranial cruciate deficient stifles: an in vitro experimental study. **Veterinary Surgery**, Philadelphia v.30, p.278-286, 2001.

WIJewardana V. et al. Isolation and characterization of hematopoietic progenitor cells in canine bone marrow. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Ireland, v.15, n.3-4, p.230-238, 2007.

WILKINS, R.J. Joint fluid analysis. In: BOJRAB, M.J. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.705-710, 1993.

YAZAKI, C.M. et al. Estudo comparativo entre tomografia computadorizada e artroscopia nas lesões meniscais do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**. São Paulo, v.30, n.6, 1995.

ZAMPROGNO, H. Células-tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.35, n.2, p.289-290, 2007 a.

ZAMPROGNO, H. TPLO: uma nova e eficaz opção na cirurgia para RLCCr. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre, v.35, n.2, p.275-276, 2007 b.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)