



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE DE PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

LUCIANA FERREIRA PANTOJA

TERAPIA CELULAR EM CÃES COM DISPLASIA COXOFEMORAL

BELÉM
2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE DE PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

LUCIANA FERREIRA PANTOJA

TERAPIA CELULAR EM CÃES COM DISPLASIA COXOFEMORAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Erika Renata Branco

BELÉM

2018

LUCIANA FERREIRA PANTOJA

TERAPIA CELULAR EM CÃES COM DISPLASIA COXOFEMORAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em _____ de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Érika Renata Branco – Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA

Prof^a. Dr^a. Patricia Cristina Beltrão Braga – 1º Examinador
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP

Prof^o. Dr^o Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira – 2º Examinador
INSTITUTO DE PESQUISA EVANDRO CHAGAS – IEC

Prof^o. Dr^o Edinaldo da Silva Filho – 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA

"A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos"

(Marcelo Proust)

DEDICATÓRIA

Este trabalho está dedicado à minha amada mãe Eliana Pantoja, que sempre foi e é um grande exemplo de força. Te amo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora **Dr^a. Érika Renata Branco**, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe no desenvolvimento de novos direcionamentos científicos, pelo carinho com seus alunos e pelo exemplo de seriedade e comprometimento a ser seguido.

À minha co-orientadora, Professora **Dr^a. Ana Rita de Lima**, pela confiança e pelo espaço que me foi dado desde o primeiro dia no Hospital Veterinário Mário Dias Teixeira- HOVET-UFRA. Muito obrigada professora!

À **Luane Lopes Pinheiro** por todo apoio prestado para a realização desse trabalho, pela paciência durante os repetidos protocolos de cultivo celular, disponibilidade e parceria nos dias de treinamento. Obrigada por dividir seu conhecimento e experiência comigo.

À toda equipe técnica do Laboratório de Cultivo de Tecido e Citogenética do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas por todas as dúvidas tiradas e todo apoio prestado durante os dias de trabalho. Em especial ao professor **Dr^o. Edivaldo Herculano de Oliveira**, pela amigável simpatia com que nos recebeu e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Professor **Dr^o. Leandro Coutinho**, pela Co-orientação e auxílio dado durante a realização do projeto. Ao setor de imagem do hospital, que sempre me ajudou nos dias de realização dos exames, em especial a **Dr^a. Edileia** e ao amigo Jason por todo apoio prestado.

A direção do Hovet em especial a **Dra Márcia**, que disponibilizou todo material necessário para o desenvolvimento desse trabalho, e aos colegas de residência que sempre deram apoio durante os dias de rotina no hospital.

À **Deus**, pelas descobertas e possibilidade de novos recomeços. Obrigado pai pelas vivências de mundo e pelas trocas maravilhosas que tive. À minha família que sempre me incentivo e aos amigos mais próximos, Danielli Martinelli e Joaquim Neto pelos descontraídos e maravilhosos momentos compartilhados. Amo vocês.

RESUMO

PANTOJA, L. F. **Terapia celular em cães com displasia coxofemoral**. 2018. 64 f. Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2018.

A displasia coxofemoral é uma doença caracterizada pelo desenvolvimento anormal da articulação do coxal, muito comum em cães de médio porte, tendo como consequência a degeneração articular. O tratamento da doença inclui uma variedade de opções terapêuticas, entretanto, nenhuma é considerada ideal para a melhora definitiva do paciente. Devido ao potencial para diferenciação, capacidade de autorrenovação e elevada plasticidade, as células-tronco mesenquimais (CTMs) vem sendo consideradas como uma opção de tratamento na reparação de lesões de cartilagem. Assim, objetivou-se avaliar a melhora clínica de cães diagnosticados com displasia coxofemoral e submetidos à infusão intra-articular de células-tronco mesenquimais, autólogas, derivadas de tecido adiposo. Foram utilizados quatro cães adultos, diagnosticados por meio de radiografia bilateral. Após colheita de tecido adiposo de cada paciente, as células-tronco mesenquimais foram isoladas por digestão enzimática, cultivadas e expandidas, testada viabilidade, analisada a morfologia, diferenciação, imunofenotipagem e estabilidade cromossômica. As CTMs foram infundidas no espaço intra-articular da articulação coxofemoral, na quantidade de 1×10^6 células, com intervalo de aproximadamente 18 dias entre as infusões, num total de duas infusões. Todos os animais submetidos as infusões de células-tronco intra-articular apresentaram melhora quando as características clínicas da doença, no entanto, não foram observadas modificações nos padrões radiográficos e ultrassonográficos dos animais avaliados.

Palavras-chave: Displasia coxofemoral, cão, células-tronco-mesenquimais, tecido adiposo, terapia celular.

ABSTRACT

PANTOJA, L. F. **Cell therapy in dogs with coxofemoral dysplasia.** 2018. 64 f. Master of Animal Health and Production in Amazonia, Federal Rural University of Amazonia, 2018.

Coxofemoral dysplasia is a disease characterized by the abnormal development of the joint of the coxal, very common in medium-sized dogs, resulting in joint degeneration. The treatment of the disease includes a variety of therapeutic options, however, none is considered ideal for the definitive improvement of the patient. Due to the potential for differentiation, self-renewal capacity and high plasticity, mesenchymal stem cells (MSCs) have been considered as a treatment option in the repair of cartilage lesions. The aim of this study was to evaluate the clinical improvement of dogs diagnosed with coxofemoral dysplasia and submitted to intra-articular infusion of autologous mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. Four adult dogs were used, diagnosed by bilateral radiography. After harvesting adipose tissue from each patient, mesenchymal stem cells were isolated by enzymatic digestion, cultured and expanded, viability tested, morphology, differentiation, immunophenotyping and chromosomal stability were analyzed. The CTMs were infused into the intra-articular space of the hip joint, in the amount of 1×10^6 cells, with an interval of approximately 18 days between the infusions, in a total of two infusions. All animals submitted to intra-articular stem cell infusions showed improvement when the clinical characteristics of the disease, however, no changes were observed in the radiographic and ultrasonographic patterns of the animals evaluated.

Key words: Coxofemoral dysplasia, dog, mesenchymal stem cells, adipose tissue, cell therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Articulação coxofemoral. 1: Acetábulo; 2: Cabeça do Fêmur; 3: Fêmur; 4: Ligamento transverso do acetábulo; 5: Ligamento da cabeça do fêmur. Fonte: ANATOMY OF THE DOG, 2012.....	18
Figura 2-	Osso pélvico de canino apresentando suas particularidades anatômicas. 1: Ílio; 6: Púbis; 8: Ísquio; 10: Porção articular do acetábulo; 11: Fossa Articular. Fonte: DYCE, 2010.....	19
Figura 3-	Osso Fêmur de Canino. A: Vista cranial; B: Vista caudal; C: Vista lateral; 1: Cabeça femoral; 2: Colo do femoral; 3: Trocânter maior; 4: Trocânter menor; 5: Fossa trocântérica. Fonte: DYCE, 2010.....	19
Figura 4-	Auto-replicação e diferenciação celular. A: Auto replicação celular, onde uma célula origina outra idêntica; B: Diferenciação celular, onde uma célula origina outra diferente. Fonte: Researchgate.net	27
Figura 5-	Fontes diferentes de obtenção de células-tronco. A: Diferentes estágios de desenvolvimento embrionário. B: Feto de canino em desenvolvimento, C: Canino adulto. Fonte: libn.com.....	28
Figura 6-	Posicionamento radiográfico para o diagnóstico de displasia coxofemural. A: Incidência ventrodorsal da articulação coxofemoral; B: Radiografia de articulação coxofemoral sem displasia, onde se observa ausência de alterações radiográficas; C: Radiografia de articulação coxofemoral com displasia, onde observa-se luxação bilateral. Fonte: Ortopet.....	32
Figura 7-	Infusão das CTM intra-articular. A: Exame ultrassonográfico para localização do espaço intra-articular coxofemoral em canino portador de displasia coxofemoral; B: Aplicação das CTM diretamente no espaço intra-articular.	36
Figura 8-	Fotomicroscopia de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de cão em cultivo <i>in vitro</i> . A: Células em P0 com 24 horas de cultivo apresentando morfologia semelhante a fibroblasto; B: Células em P0 após 7 dias de cultivo, apresentando confluência de 95%. Barra de escala: 100 µm.....	37
Figura 9-	Fotomicroscopia de imunocitoquímica de CTMTA de cães em P4 com marcação positiva para anti-CD73, Vimentina e anti-CD105 e marcação negativa para anti-CD34 e anti-CD45, evidenciando o núcleo celular corado pelo Dapi. Barra de escala: 100 µm. Fonte: PINHEIRO, L. L. (2017).....	39
Figura 10-	Resultado do RT-PCR de CTM em P8, com expressão para marcadores mesenquimais e baixa expressão para marcador hematopoiético, bem como ausência para CD45, Oct4, Nanog e Sox2. Fonte: PINHEIRO, L. L. (2017)..	40
Figura 11-	Diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica de CTMs. A: Evidenciando produção de matriz de cálcio extracelular pela coloração de Alizarin Red. B: Evidenciando produção de tecido adiposo pela coloração de OilRed, C: Evidenciando produção de matriz extracelular rica em	

	glicosaminoglicanos pela coloração de Alcian Blue. Barra de escala: 100 μ m, 50 μ m, 50 μ m. Fonte: PINHEIRO, L. L. (2017).....	41
Figura 12-	Radiografia de coxofemoral dos pacientes cd1 (A), cd2 (B), cd3 (C) e cd4 (D) realizada antes da primeira infusão de CTMs. A: Articulações coxofemorais, cabeça femoral e superfície do acetábulo incongruentes (seta preta), ângulo de Norberg entre 90°- 100°, colos femorais espessados (seta amarela). B: Articulações coxofemorais, cabeças femorais e superfícies dos acetábulo incongruentes (seta preta) e ângulo de Norberg entre 90°-95°.C: Articulações coxofemorais e superfícies acetabulares incongruentes (seta preta), ângulo de Norberg entre 95°-100°. D: Articulações coxofemorais congruentes (seta preta), ângulo de Norberg entre 100°- 110°, colos femorais discretamente espessados (seta amarela).....	42
Figura 13-	Imagem ultrassonográfica de articulação coxofemoral de cd1 com displasia coxofemoral realizada no dia da primeira infusão de CTMs. A: Observa-se irregularidade na superfície de cabeça femoral esquerda (seta branca) (CFE). B: Observa-se irregularidades na superfície articular de cabeça femoral direita (seta amarela) (CFD).....	43
Figura 14-	Imagem ultrassonográfica de articulação coxofemoral de cd2 com displasia coxofemoral, realizada no dia da primeira infusão de CTMs. A: Observa-se irregularidade na superfície de cabeça femoral esquerda (seta branca) (CFE). B: Observa-se sangramento em área articular de cabeça femoral direita (seta amarela) (CFD).....	44
Figura 15-	Imagem ultrassonográfica de articulação coxofemoral de cd3 com displasia coxofemoral realizada no dia da primeira infusão de CTMs. A: Observa-se irregularidade na superfície de cabeça femoral esquerda (seta branca) (CFE). B: Observa-se irregularidades na superfície articular de cabeça femoral direita (seta amarela) (CFD).....	44
Figura 16-	Imagem ultrassonográfica de articulação coxofemoral de cd4 com displasia coxofemoral realizada no dia da primeira infusão de CTM. A: Observa-se ausência de irregularidade em superfície de cabeça femoral esquerda (seta branca) (CFE). B: Observa-se ausência de irregularidade em superfície de cabeça femoral direita (seta amarela) (CFD).....	45
Figura 17-	Avaliação visual dos tutores quanto a presença dos sinais clínicos de DCF após a primeira infusão dos pacientes inclusos no projeto.....	46
Figura 18-	Avaliação visual dos tutores quanto a presença dos sinais clínicos de DCF após a segunda infusão dos pacientes inclusos no projeto.....	47
Figura 19-	Avaliação clínica articular quanto a presença dos sinais clínicos característicos da doença após a primeira infusão dos pacientes inclusos no projeto.....	48
Figura 20-	Avaliação clínica articular quanto a presença dos sinais clínicos característicos da doença após a segunda infusão dos pacientes inclusos no projeto.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Apresentação dos diferentes graus de displasia coxofemoral e suas respectivas características clínicas. Fonte: ROCHA et al, 2008.....	25
Tabela 2-	Viabilidade celular das infusões de CTM em cd1.....	38
Tabela 3-	Viabilidade celular das infusões de CTM em cd2.....	38
Tabela 4-	Viabilidade celular das infusões de CTM em cd3.....	38
Tabela 5-	Viabilidade celular das infusões de CTM em cd4.....	39

GLOSSÁRIO

Luxação: Deslocamento ósseo com relação ao seu ponto de articulação normal.

Hereditariedade: Conjunto de processos relativos a transmissão das características genéticas entre os indivíduos.

Herança Poligênica: Interação entre vários pares de genes para determinar uma característica, cada um com efeito aditivo sobre o outro.

Ângulo de Norberg: Ângulo de inclinação, índice cortical e o percentual de cobertura da cabeça femoral de ambos os lados.

Ácido hialurônico: Biopolímero responsável pelo aumentando da viscosidade do líquido sinovial, hidratação e proteção das articulações.

Claudicação: Termo utilizado para definir dor, cansaço ou sensação de fraqueza nas pernas que ocorre durante o exercício.

Sinal de ortolani: Som produzido na articulação durante o movimento de abdução articular, que corresponde à entrada da cabeça femoral no acetábulo

Ângulo de Norberg: Mensuração de frouxidão articular visível na projeção padrão, sendo um dos critérios utilizados para determinar a qualidade do quadril.

Pectinectomia: Secção do músculo da virilha, que ajuda a melhorar o ângulo da articulação da região, que evita a dor.

Osteotomias corretivas: Seccionamento cirúrgico de um osso, com o fim de corrigir uma restauração ou deformidade do esqueleto, ou por consolidação viciosa de fratura, ou por anomalias congênitas ou adquiridas.

Artroplastias de bordas acetabulares: Tratamento cirúrgico de substituição de uma articulação natural comprometida por outro quadril protético

Osteotomia pélvica tripla: Técnica cirúrgica onde o acetábulo é solto da posição anatômica e rodado de forma a cobrir a cabeça femoral.

Autorreplicação: Capacidade de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1.	ARTICULAÇÃO COXOFEMORAL	18
3.2	DISPLASIA COXOFEMORAL	20
3.2.1	Etiologia	21
3.2.2	Patogenia	22
3.2.3	Sinais Clínicos	22
3.2.4	Diagnóstico	23
3.2.5	Tratamento	26
3.3	CÉLULAS-TRONCO	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	SELEÇÃO DOS ANIMAIS	31
4.1.3	Exame Radiográfico	31
4.1.4	Exame ultrassonográfico	32
4.1.5	Colheita de Sangue Venoso e Urina	32
4.1.6	Colheita de Tecido Adiposo	33
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS CTMs	33
4.2.1	Isolamento, Cultivo, Viabilidade e Morfologia Celular	33
4.2.2	Imunocitoquímica	34
4.2.3	RT-PCR	34
4.2.4	Diferenciação	35
4.3	INFUSÃO DAS CTMs	36
4.4	AVALIAÇÃO APÓS INFUSÃO DAS CTMs	36
5	RESULTADOS	37
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS CTMS	37
5.1.1	Cultivo, Expansão e Morfologia	37
5.1.2	Viabilidade	38

5.1.3	Imunocitoquímica	39
5.1.4	RT-PCR	40
5.1.5	Diferenciação	40
5.2	RESULTADOS RADIOGRÁFICOS PRÉ E PÓS-INFUSÃO DE CTM.....	41
5.3	RESULTADOS ULTRASSONOGRÁFICOS PRÉ E PÓS-INFUSÃO DE CTM ..	43
5.4	AVALIAÇÃO VISUAL DO PACIENTE APÓS INFUSÕES	45
5.5	AVALIAÇÃO CLÍNICA DA ARTICULAÇÃO COXOFEMORAL	47
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	53
8	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO I	64
	ANEXO II.....	65

1 INTRODUÇÃO

A displasia coxofemoral (DCF) é uma doença ortopédica observada em cães, que se caracteriza pelo desenvolvimento anormal da articulação do coxal, com consequente degeneração dos componentes articulares (HULSE & JOHNSON, 2002; RAWSON *et al*, 2005).

Os quadros de DCF são muito comuns nos animais de companhia (BRANCO, 2011), afetando principalmente cães de médio e grande porte (FERREIRA *et al*, 2007, BARROS, 2008). Porém, já existem relatos nos cães de pequeno porte (BRANCO, 2011).

As causas da doença são multifatoriais, incluindo fatores hereditários, ambientais, nutricionais e hormonais. No entanto, não se conhece seguramente qual a exata etiologia da afecção (HULSE & JOHNSON, 2002; DASSLER, 2003).

A apresentação clínica da doença é bastante variável, os pacientes podem apresentar claudicação uni ou bilateral, passos curtos, intolerância ao exercício e dificuldade em levantar-se e subir degraus (TOMLINSON & MCLAUGHLIN, 1996; HULSE & JOHNSON, 2002; RAWSON *et al*, 2005).

O diagnóstico da doença pode ser baseado no histórico do paciente, nos sinais clínicos apresentados, exame clínico, exame ortopédico e nos achados radiográficos (OLMSTEAD, 2003).

O tratamento pode incluir cirurgias, regeneradores articulares e analgésicos, todos com o objetivo de minimizar a dor do animal (BRANCO, 2011), revelando uma variedade de opções terapêuticas clínicas ou cirúrgicas, entretanto, nenhuma é considerada ideal para a melhora do quadro clínico do paciente (DASSLER, 2007).

Nesse contexto, os pesquisadores vêm buscando alternativas ousadas, que possam orientar no tratamento mais eficaz de enfermidades articulares degenerativas, lançando mão da utilização de CTMs, uma vez que estas possuem potencial para diferenciação, capacidade de autorrenovação e elevada plasticidade (BAUGÉ & BOUMÉDIENE, 2015).

As CTMs são uma linhagem de células-tronco somáticas, presentes em regiões perivasculares de tecidos adultos, responsáveis pela regeneração e manutenção destes (KEATING, 2012) e devido a estes fatores, nos últimos anos, pesquisadores e cirurgiões vem elaborando intervenções de reparação de cartilagem para pacientes que sofrem danos articulares. Contudo, os métodos atuais não restauram perfeitamente a cartilagem hialina e pode levar à fibrose ou hipertrofia (BAUGÉ & BOUMÉDIENE, 2015).

Diante do exposto objetivou-se avaliar a segurança e eficácia ou não do transplante autólogo intra-articular de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMs) em pacientes caninos portadores de DCF.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Avaliar o uso intra-articular de CTMs em pacientes caninos portadores DCF.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a eficácia da utilização das CTMs em cães displásicos;
- Avaliar a segurança da utilização das CTMs em cães displásicos;
- Acompanhar por exames radiográficos e ultrassonográficos alterações morfológicas na articulação do coxal de cada animal selecionado, após a infusão celular;
- Avaliar se haverá recidiva da enfermidade, caso o tratamento proposto ofereça resultado;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ARTICULAÇÃO DO COXAL

A articulação do coxal é caracterizada pela presença de cartilagem, cápsula, cavidade articular e líquido sinovial, em que a cabeça femoral hemisférica articula com o acetábulo, localizado no interior da pelve (MILLER; CHRISTENSEN, 1974). Seu aspecto anatômico o possibilita estabilidade e uma grande variação de movimentos articulares (**Figura 1**) (GETTY, 1986; MANLEY, 1998).

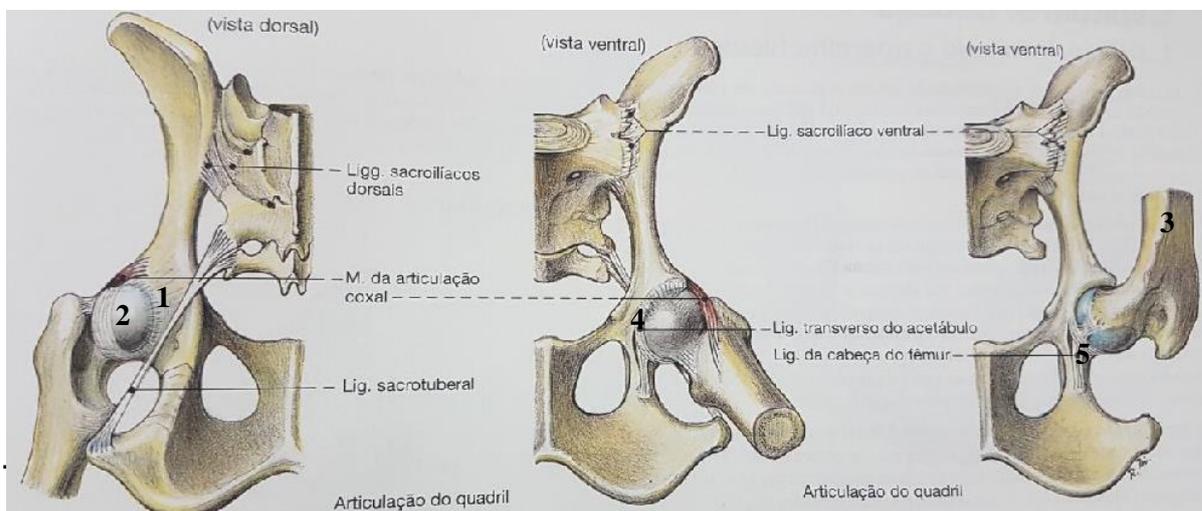


Figura 1. Articulação do coxal. 1: Acetábulo; 2: Cabeça do Fêmur; 3: Fêmur; 4: Ligamento transverso do acetábulo; 5: Ligamento da cabeça do fêmur. Fonte: ANATOMY OF THE DOG, 2012.

O acetábulo é uma cavidade formada pelo ílio, ísquio e púbis (**Figura 2**) (MILLER & CHRISTENSEN, 1974), existindo uma área articular chamada de superfície semilunar, que apresenta em sua borda craniodorsal osso subcondral espesso e resistente para suportar elevadas pressões (HAUPTMAN, 1985). Na região do centro acetabular encontra-se a fossa acetabular, onde estão inseridos o ligamento redondo e o acetabular transverso, que contorna a região ventral da cabeça femoral, aumentando a estabilidade da articulação coxofemoral (RISER, 1975).

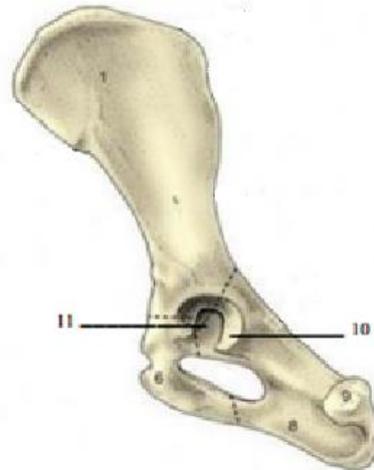


Figura 2. Osso pélvico de canino apresentando suas particularidades anatômicas. 1: Ílio; 6: Púbis; 8: Ísquio; 10: Porção articular do acetábulo; 11: Fossa Articular. Fonte: DYCE, 2010.

A cabeça femoral é toda revestida de cartilagem, com exceção de uma região que apresenta depressão em sua porção caudomedial, denominada fôvea, região destinada a inserção do ligamento da cabeça do fêmur (**Figura 3**) (MILLER & CHRISTENSEN, 1974).

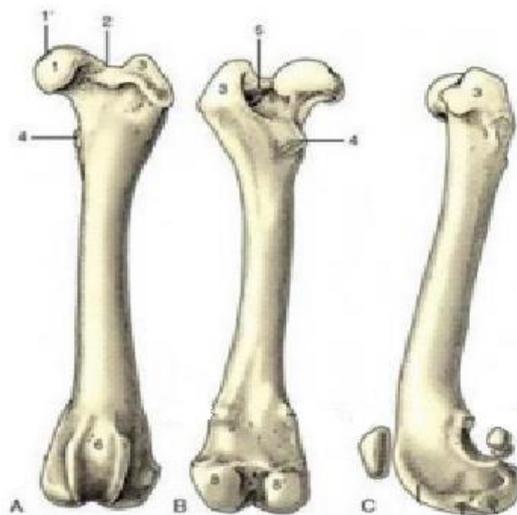


Figura 3. Osso Fêmur de Canino. A: Vista cranial; B: Vista caudal; C: Vista lateral; 1: Cabeça femoral; 2: Colo do femoral; 3: Trocânter maior; 4: Trocânter menor; 5: Fossa trocantérica. Fonte: DYCE, 2010.

O ligamento da cabeça do fêmur se estende desde a fôvea até a fossa do acetábulo, amplamente intracapsular e coberto por membrana sinovial (LIEBICH *et al*, 2011). Em condições normais, este ligamento é responsável por exercer a função de reter os movimentos

que ameaçam a estabilidade articular (DYCE, 2010), quando necessário, este ligamento pode desenvolver hipertrofia compensatória para aumentar sua resistência (SCHOENECKER *et al*, 1984). Entretanto, a hipertrofia ligamentar presente na DCF agrava a instabilidade articular, uma vez que ocupa mais espaço intra-articular e favorece a subluxação da cabeça femoral (LUST *et al*, 1980).

3.2 DISPLASIA COXOFEMORAL

A palavra displasia tem origem grega, derivando de “dys” que significa anormal e “plassein” formar (MORGAN & STEPHENS, 1985; ALLAN, 2002; WOOD & LAKHANY, 2003). Logo, o termo DCF significa formação anormal da articulação do coxal. Em 1930 Schenelle fez a primeira descrição da doença, na época conhecida como subluxação congênita bilateral da articulação do coxal (SMITH, 1997).

A DCF é considerada uma anormalidade do desenvolvimento da articulação do coxal caracterizada pela instabilidade do quadril, tendo como característica anatômica o arrasamento do acetábulo e alterações na cabeça e colo do femoral, levando, conseqüentemente à doença articular degenerativa secundária (DASSLER, 2007).

Diferentes fatores que podem estar associados à origem da doença, dentre estes fatores podem ser citados a estrutura e conformação corpórea, alterações no desenvolvimento ósseo muscular, rápido crescimento corpóreo, nutrição deficiente ou excessiva (proteínas, cálcio e fósforo), distrofia do músculo pectíneo, atrofia muscular pélvica, excesso de exercícios físicos em cães jovens, distúrbios hormonais e fatores ambientais (BETTINI *et al*, 2007).

Dentre as raças mais afetadas pelo distúrbio displásico estão Pastor Alemão, São Bernardo, Rottweiler, Golden e Labrador Retriever, Pointer e Fila Brasileiro, entretanto, as raças de pequeno porte não estão isentas de sofrer de displasia DCF, porém, com menor frequência (MCLAUGHLIN, 2003; ALVARENGA, 2006), a doença também pode acometer felinos domésticos, sendo a raça Devon Rex a mais suscetível (DENNY, 2006).

Existem descrições na literatura da ocorrência da doença tanto em cães machos quanto em fêmeas de todas as idades (MINTO *et al*, 2012). Assim, diante do caráter genético desta enfermidade, aconselha-se que os animais acometidos pela doença sejam selecionados e retirados da reprodução por meio de castração (BETTINI *et al*, 2007).

De forma geral, a prevalência da DCF é muito variável dentre as raças, sendo difícil definir a frequência que a doença pode aparecer, pois, apesar do seu surgimento ser dependente

da raça, fatores como ambiente, forma de diagnóstico, idade do paciente e época da realização do exame radiográfico são fatores que podem afetar os dados obtidos por pesquisadores (RETTENMAIER *et al*, 2002, PASTER *et al*, 2005).

3.2.1 ETIOLOGIA

As causas da DCF são multifatoriais, sendo a hereditariedade o elemento determinante para o surgimento da doença (FOSSUM, 2014), a doença agrava-se por influência de falha no desenvolvimento da articulação do coxal, devido à predisposição para desenvolver desequilíbrios articulares que conduzem a consequente degeneração desses componentes (BETTINI *et al*, 2007).

A base da DCF é a herança poligênica originada pela interação de muitos genes (TODHUNTER *et al*, 1999), com característica aditiva, influenciando a susceptibilidade individual para a doença, que será determinada pelo número total de genes ligados à displasia bem como a interação de fatores ambientais (REMEDIOS & FRIES, 1995, MARSCHALL & DISTL, 2007).

Os fatores ambientais não causam diretamente a displasia, entretanto, desempenham papel fundamental para o aparecimento da doença em cães com suscetibilidade genética (FRIES & REMEDIOS, 1995; LUST & TODHUNTER, 2007). Assim, cães que possuem o genótipo característico para a DCF podem apresentar o fenótipo diferente, devido às diferenças ambientais pelo quais foram expostos (SMITH *et al*, 1990).

Algumas teorias propõem que a DCF decorre de subdesenvolvimento da massa muscular pélvica, onde anormalidades no músculo pectíneo resultariam em deslocamento cranial do acetábulo e consequentes alterações anatômicas secundárias (TOMLINSON & MCLAUGHLIN, 1996). Outras vinculam a instabilidade articular com desigualdade no desenvolvimento dos tecidos ósseos e musculares pélvicos devido ao ganho de peso por ingestão nutricional excessiva durante o crescimento (FROES *et al*, 2009).

Outros fatores que podem ser citados incluem traumas leves e repetidos na superfície articular do coxal ou exercícios intensos, que podem ser importantes no desenvolvimento da DCF (FOSSUM, 2014).

Defeitos genéticos também podem surgir na constituição do líquido sinovial. Existe a hipótese de que a diminuição da concentração de ácido hialurônico resulta na redução da

viscosidade do fluido intra-articular e em consequência, ocorre diminuição da coesão natural entre as superfícies articulares, resultando em frouxidão articular (DENNY, 2006).

3.2.2 PATOGENIA

Devido à pressão que é submetida, a cartilagem sofre graves modificações estruturais, no qual, no início da doença se encontra áspera e com presença de fissuras, e no decorrer da afecção seu aspecto transparente esbranquiçado se transforma na cor amarelo acinzentado e em outras vezes vermelho amarronzado (SANTANA *et al*, 2010).

A instabilidade articular é considerada a primeira modificação que ocorre na articulação do coxal (WALLACE, 1987; SMITH *et al*, 1990; LUST *et al*, 1993). O motivo dessa frouxidão articular não é conhecido, porém acredita-se que um aumento da permeabilidade da cápsula articular possibilita o acúmulo de líquido sinovial e a pressão causada por este acúmulo permite a frouxidão da articulação (MADSEN, 1997).

A frouxidão articular pode levar à subluxação da cabeça do fêmur quando há aplicação de carga ou mudança das forças atuantes sobre a articulação (ALEXANDER, 1992). Na articulação subluxada o estresse é maior, pois as forças que agem sobre a cartilagem articular estão espalhadas por uma área de superfície menor, à medida que em condições normais, essas forças estão distribuídas em maior área (LUST & TODHUNTER, 2007).

3.2.3 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da DCF variam de acordo com a idade, raça do animal e grau de comprometimento articular. Conforme comentado anteriormente, as raças de grande porte são mais suscetíveis ao desenvolvimento de alterações clínicas, embora, mesmo nessas raças, muitos cães com achados radiográficos característicos da doença permaneçam assintomáticos. (DENNY, 2006; PIERMATTEI, 2009).

Devido à diversidade de alterações articulares a apresentação clínica da doença é muito variável, desta forma, a DCF pode se apresentar de forma leve até severa, havendo diferenças clínicas entre os pacientes dos diversos graus, principalmente relacionadas à marcha (SOUZA *et al*, 2015).

Clinicamente existem duas formas de DCF, que são a aguda e a crônica. A aguda aparece em filhotes e se caracteriza por dor articular intensa, claudicação unilateral ou bilateral, dificuldade de levantar, intolerância a exercícios e subdesenvolvimento dos músculos pélvicos (BRINKER, 1999; HULSE & JOHNSON, 2002). Durante o exame clínico pode ser observado “andar de coelho” e sinal de Ortolani positivo (DASSLER, 2003; PIERMATTEI *et al*, 2006), que consiste no barulho produzido na articulação durante o movimento de abdução articular, que corresponde à entrada da cabeça femoral no acetábulo, indicando que a articulação foi reduzida e que a cápsula articular está flácida (SOUZA & TUDURY, 2003).

Radiograficamente, esses cães apresentam as cabeças femorais com conformação normal, mas algum grau de luxação pode ser observado, e o ângulo de Norberg pode aumentar além de 146° (PIERMATTEI *et al*, 2006).

O ângulo de Norberg é uma mensuração de frouxidão articular visível na projeção padrão, sendo um dos critérios utilizados para determinar a qualidade do quadril (normal, displásico). Ângulo de Norberg menor que 105 denotam subluxação (HENRY, 1992, MCLAUGHLIN JR. & TOMLINSON, 1996).

O estágio crônico da doença caracteriza-se por sinais clínicos decorrentes de alterações articulares degenerativas, onde estão presentes dor, diminuição da amplitude de movimento da articulação e artrite progressiva (ALMEIDA, 2008). Durante o exame clínico o sinal de Ortolani raramente está presente devido ao arrasamento do acetábulo e fibrose da cápsula articular (BRINKER, PIERMATTEI, FLO, 1999), podendo ser observado crepitação à manipulação do membro, restrição de movimentos articulares e atrofia muscular dos membros pélvicos.

Radiograficamente esses cães apresentam maior arrasamento do acetábulo resultando em menor ângulo de Norberg, menor porcentagem de cobertura da cabeça do fêmur e maior grau de displasia coxofemoral (GENUÍNO, 2010).

3.2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DCF tem como base o histórico, sinais clínicos e resultados do exame ortopédico, onde pode estar presente o aumento no índice de distração; claudicação, sinal de Ortolani positivo, dificuldade em se levantar; relutância em correr e saltar; dor; crepitação à manipulação da articulação; atrofia muscular nos membros pélvicos e hipertrofia de músculos do membro torácico (TUDURY, 2004).

Durante a avaliação clínica a inspeção visual pode identificar muitas alterações clínicas características da doença como a mudança na conformação pélvica do animal. Conforme Souza e Tudury (2003), balanço espinhal ou rotação pélvica durante o andar, passos encurtados e enrijecido e deslocamento do peso corporal para os membros torácicos (DASSLER, 2003).

Para o diagnóstico definitivo são necessárias radiografias na incidência ventrodorsal, de maneira que possam ser visibilizados cabeça e colo femoral de ambos os membros, além do bordo acetabular (BETTINI *et al*, 2007) e o animal deve ser sedado para evitar sua movimentação. Após sedação é feito o posicionamento em decúbito dorsal, membros pélvicos estendidos caudalmente e rotacionados medialmente, mantendo o paralelismo entre si, com a coluna vertebral e a mesa (LUST, 1985).

Os exames radiográficos caracterizam a DCF pelo arrasamento do acetábulo, achatamento da cabeça do fêmur, subluxação ou luxação coxofemoral e alterações secundárias da articulação (LUST, 1997; KEALY & MACALLISTER, 2005).

De acordo com o Colégio Brasileiro de Radiologia Veterinária (CBRV) a idade ideal para a confirmação do diagnóstico de displasia coxofemoral é a partir de 24 meses (NOGUEIRA *et al*, 2005; NORMAS, 2009).

O ângulo de Norberg e as demais características radiográficas adotadas pelo Colégio Brasileiro de Radiologia Veterinária (CBRV) como parâmetros para o estabelecimento dos diferentes graus de DCF, sendo ela classificada em: displasia leve ou discreta, displasia média ou moderada e displasia grave (NORMAS, 2009). A classificação é dividida em cinco categorias, de acordo com as características encontradas (ROCHA *et al*, 2008) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Apresentação dos diferentes graus de DCF e suas respectivas características clínicas.
 Fonte: ROCHA *et al*, 2008.

Graus de DCF	Características clínicas
Grau A	Articulação normal, cabeça femoral e acetábulo congruentes, ângulo de Norberg 105 °.
Grau B	Articulações próximas da normalidade, cabeça femoral e acetábulo levemente incongruentes, ângulo de Norberg 105 °.
Grau C	Displasia coxofemoral leve, cabeça femoral e acetábulo incongruentes, ângulo de Norberg 100 °.
Grau C	Displasia coxofemoral moderada, evidente incongruência entre a cabeça femoral e o acetábulo, sinais de subluxação e ângulo de Norberg 95 °.
Grau E	Displasia coxofemoral grave, evidentes alterações displásicas, sinais de luxação ou distinta subluxação, achatamento da borda acetabular, deformação da cabeça femoral e ângulo de Norberg - 90°.

Outras formas de avaliação da articulação do coxal incluem ultrassonografia, principalmente para detecção de produção exacerbada de fluido sinovial (GINJA *et al*, 2009). Ressonância magnética apesar de usada com menor frequência, revela detalhes não visibilizados na radiografia comum (ROCHA *et al*, 2008).

É importante observar que os sinais clínicos nem sempre estão associados aos achados radiográficos. O diagnóstico correto da DCF deve ser realizado com base na idade, raça, histórico, achados físicos e alterações radiográficas (FOSSUM, 2014).

3.2.5 TRATAMENTO

Entre as formas de tratamento, são descritas a conservativa e a cirúrgica. O tratamento conservativo da DCF inclui recomendações nutricionais, controle de peso, restrição a exercícios, reabilitação física e administração de suplementos nutracêuticos (TOMLINSON & McLAUGHLIN, 1996). O objetivo do tratamento é a redução da dor, restaurando a funcionalidade do membro e dando ao paciente, qualidade de vida (ANDERSON, 2011).

A escolha do tratamento mais adequado depende de inúmeros fatores como idade, tamanho e atividade do paciente, ambiente doméstico, grau de DCF e de osteoartrite, qualidade e profundidade do acetábulo, formato da cabeça femoral, presença ou não de afecções concomitantes, além dos custos do tratamento médico e cirúrgico e preferências do Médico Veterinário (HULSE & JOHNSON, 2002).

Os nutracêuticos como a condroitina e glucosamina que possuem efeito anti-inflamatório benéfico são citados no tratamento clínico, assim como os condroprotetores, por serem importante constituinte da cartilagem hialina (SANTANA *et al*, 2010). O primeiro inibe ação de enzimas que degradam cartilagem, já a glucosamina estimula produção de colágeno e proteoglicanos pelos condrócitos, havendo efeito condroprotetor sinérgico pelas duas moléculas (BEYNEN, 2003). Contudo o efeito desses medicamentos é lento, sendo preciso 6 a 8 semanas para observar resultados (HENROTIN *et al*, 2005).

As técnicas cirúrgicas podem ser divididas em procedimentos para prevenir ou limitar o desenvolvimento da displasia é aqueles de salvamento, para redução ou eliminação da dor e assim melhorar a função do membro (DEJARDIN & SCHULZ, 2007; MINTO *et al*, 2016).

Várias técnicas cirúrgicas são descritas para o tratamento da DCF, como pectinectomia, osteotomias corretivas, artroplastias de bordas acetabulares, osteotomia pélvica tripla e outras técnicas similares, no entanto ainda mostram resultados controversos (MATIS 2000, KINZEL *et al*, 2002), porém, outros tratamentos vêm sendo instituídos na rotina clínica, no intuito de melhores resultados (KAPATKIN *et al*, 2006).

No tratamento da DCF, seja conservativo ou cirúrgico, não existe uma definição na literatura sobre qual terapia traz melhor resultado. Muitas alternativas terapêuticas já foram descritas visando proporcionar ao paciente melhor qualidade de vida, redução da dor e maior liberdade de movimentos (FERRIGNO *et al*, 2004), entretanto, essas técnicas ainda mostram resultados controversos (FERRIGNO, 2007).

Devido ao potencial para diferenciação, capacidade de autorrenovação e elevada plasticidade, as CTMs vem sendo consideradas como uma opção de tratamento para pacientes

com doenças articulares, dentre essas doenças destaca-se a displasia coxofemoral devido as graves lesões de cartilagem observadas durante o seu desenvolvimento.

3.3 CÉLULAS-TRONCO

As Células-tronco são células indiferenciadas que apresentam como principais características a capacidade de auto replicação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (**Figura 4**) (LEMISCHKA, 2005). Desta forma, acredita-se que as células-tronco tenham um importante papel regenerativo em tecidos que sofrem uma lesão ou injúria (BLAU *et al*, 2001; FODOR, 2003).

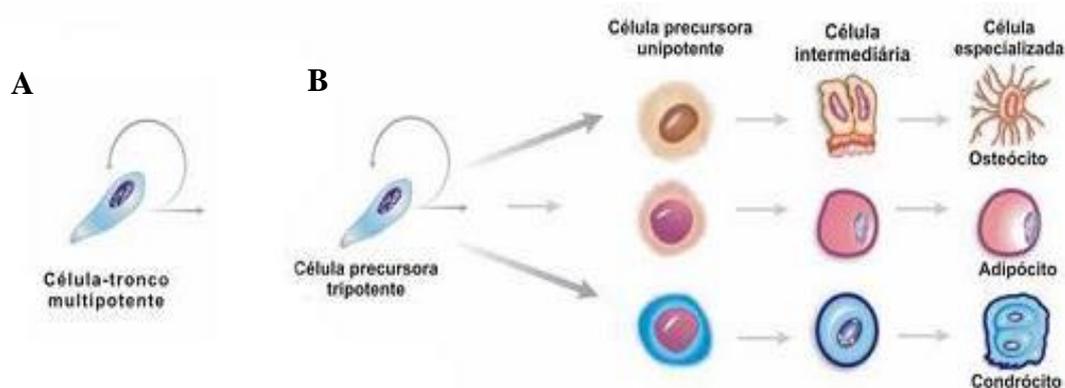


Figura 4. Auto replicação e diferenciação celular. A: Auto replicação celular, onde uma célula origina outra idêntica; B: Diferenciação celular, onde uma célula origina outra diferente. Fonte: Researchgate.net

Quanto à origem as células-tronco podem ser classificadas como embrionárias e adultas ou somáticas. As células-tronco embrionárias estão presentes na fase de desenvolvimento do zigoto e podem originar todos os tipos celulares presentes em um organismo. Entretanto, as somáticas, presentes nos tecidos adultos, quando comparadas as embrionárias possuem baixa capacidade de diferenciação celular (**Figura 5**) (GOMES, 2007).

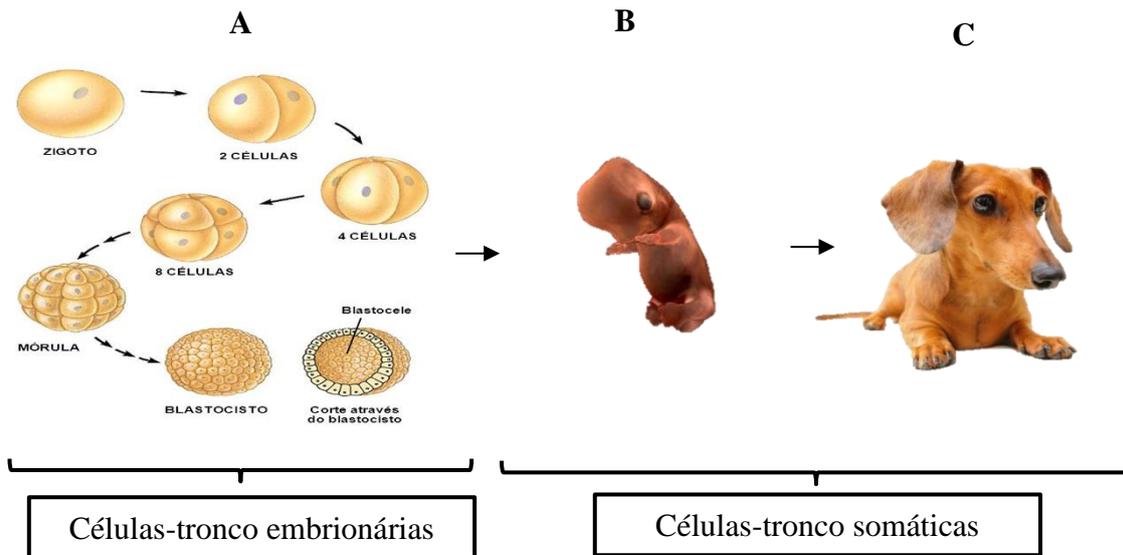


Figura 5. Fontes diferentes de obtenção de células-tronco. A: Diferentes estágios de desenvolvimento embrionário; B: Feto de canino em desenvolvimento; C: Canino adulto. Fonte: libn.com.

Quanto ao potencial de diferenciação, as células-tronco embrionárias se classificam em: a) totipotentes, derivadas do zigoto e do interior de blastocisto, capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários- transitórias no organismo e b) pluripotentes derivadas do interior dos blastocistos, possuem a capacidade de originar células derivadas das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma; (ABREU *et al*, 2008; CARRION *et al*, 2009; YARAK; OKAMOTO, 2010). Já as células-tronco adultas são divididas em: a) multipotentes, capazes de gerar tipos celulares que compõem tecidos e órgãos específicos de seu local de origem; b) oligopotentes, que ainda se diferenciam em algumas células provenientes de um mesmo folheto embrionário; e onipotentes, que se diferenciam em um único tipo celular de um folheto embrionário (NISHIKAWA *et al*, 2009).

Dentre as células-tronco adultas multipotentes estão às células-tronco mesenquimais (CTMs) ou não hematopoiéticas, descritas pela primeira vez em 1970 pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores, que as descreveram como sendo células morfologicamente semelhantes a fibroblastos (PROCKOP, 1997).

As CTMs receberam essa denominação por derivarem de folheto embrionário intermediário, o mesoderma, responsável pela formação dos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (AMORIN *et al*, 2012), como função apresentam participação na homeostase tecidual,

gerando novas células em resposta ao surgimento de lesões e apresentam capacidade de diferenciação celular (WATT & HOGAN, 2000; ODORICO *et al*, 2001).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, as CTMs devem ser caracterizadas pela aderência ao plástico, diferenciação *in vitro* em três linhagens diferentes (adipogênica, condrogênica e osteogênica), expressão de marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 e ausência de marcadores hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79 (DOMINICI *et al*, 2006; KEATING, 2012).

As CTMs podem apresentar características imunomoduladoras e imunossupressoras, secretam citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento que podem modular a resposta inflamatória, (MONTEIRO *et al*, 2010). Sob condições fisiológicas possuem habilidade de suprimir a ativação e proliferação de linfócitos T e B, células natural killer e células dendríticas, e não apresentam o complexo de histocompatibilidade classe II (MHC-II), o que pode permitir o seu transplante alogênico (SALGADO *et al*, 2010).

Uma das fontes mais conhecida de CTMs é a medula óssea, no também podem ser isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como cérebro, córnea, epitélio olfativo, polpa dentária, pulmões, músculos esqueléticos, músculos cardíacos, fígado, mucosa intestinal e tecido adiposo (GOMES, 2007). O tecido adiposo representa uma fonte rica de células para transplantes autólogos, além de ser facilmente obtido por lipoaspiração (AWAD, 2003; SCHÄFFLER, 2007; BUNNELL, 2008).

Na década de 1960 Rodbell e colaboradores introduziram o método de isolamento de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMs) (RODBELL, 1967). Os dados da literatura relatam que, de acordo com a técnica cirúrgica empregada para a colheita tecidual e o método laboratorial empregado de processamento, podem-se obter não apenas quantidades diferentes de CTMs a partir da mesma quantidade de tecido adiposo (DE UGARTE, 2003; PU, 2006), mas também CTMs com viabilidade e características diferentes (GRONTHOS *et al*, 2001). Entretanto, a viabilidade das CTMs não é alterada após a criopreservação (PU, 2006).

O cultivo *in vitro* de CTMs é o passo seguinte depois do isolamento, nesta fase ocorre a replicação celular em uma quantidade determinada para o uso clínico, que requer uma produção de células bem caracterizadas sob condições controladas. Muitos fatores podem influenciar no rendimento da expansão celular como a técnicas utilizadas, número de passagens realizadas, meio de cultura utilizado e fatores de crescimento (SENSEBÉ, 2002).

O meio de cultura é importante no cultivo de CTMs, sua função é disponibilizar o Ph e osmolaridade adequada para a sobrevivência e multiplicação celular, devendo fornecer as substâncias químicas exigidas pelas células para o seu desenvolvimento (MORAES *et al*,

2008). Após a cultura estabelecida as células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de várias passagens para se obter grandes quantidades de CTMs (BYDLOWSKI, 2009).

A integridade celular é um fator que deve ser considerado quanto à sua utilização, dentre os variados testes utilizados para determinar a viabilidade celular está o método do azul de Tripán, um corante que tem a capacidade de penetrar no interior da célula com membrana rompida (OLIVEIRA, 2008). Esse método deve refletir a integridade da membrana celular, uma vez que o sucesso de um transplante celular depende da integridade da membrana, a fim de que as células possam colonizar a área afetada em uma determinada lesão, interagindo com as demais células do hospedeiro e recuperando o tecido lesado (NAKAGE, 2009).

Devido a propensão para formar cartilagem e as grandes vantagens relacionadas à utilização de células-tronco, as CTMs têm sido o foco de inúmeras pesquisas visando a reparação da cartilagem em pacientes com osteoartrite (WHITWORTH; BANKS, 2014). Como alternativa para o tratamento de pacientes portadores de osteoartrite, a terapia celular é promissora, especialmente em tecidos com deficiência na cicatrização, como o cartilaginoso (CUCCHIARINI et al., 2016).

Existe uma grande perspectiva de uso das CTMs nas afecções degenerativas articulares (VINATIERA; GUICHEUXA, 2016). Podendo ser utilizadas no desenvolvimento de uma nova cartilagem em doenças articulares e para o restabelecimento das funções normais dos tecidos afetados (DAZZI *et al*, 2007; BRINKMAN *et al*, 2007). No entanto, o seu mecanismo de ação e potencial de regeneração da cartilagem ainda estão sob estudo, e muitos aspectos ainda precisam ser esclarecidos (PERDISA *et al*, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Este estudo está de acordo com o Comitê de Ética do Uso de Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia, sendo aprovado por meio do parecer nº 050/2016 (**Anexo I**).

Foram utilizados quatro cães adultos, o primeiro paciente da raça Pastor Alemão, fêmea de 3 anos (cd1), o segundo da raça Hottwelleir, fêmea de 3 anos de idade (cd2), o terceiro da raça Golden Retriever, macho de 2 anos (cd3) e o quarto Labrador, fêmea de 4 anos (cd4), sendo todos provenientes da rotina do Setor de Clínica Médica do Hospital Veterinário "Prof. Mário Dias Teixeira" da Universidade Federal Rural da Amazônia.

A classificação dos pacientes foi feita a partir de uma ficha de avaliação clínica aplicada como questionário em todos os pacientes selecionados (**Anexo II**), contendo os critérios clínicos de inclusão como histórico, sinais clínicos e exame ortopédico. Dentre os critérios de exclusão estavam a idade abaixo de 2 anos e a unilateralidade da doença.

4.1.1 EXAME RADIOGRÁFICO

A confirmação do diagnóstico foi realizada por meio de exames radiográficos bilaterais da articulação do coxal projetados na incidência padrão para o diagnóstico da displasia coxofemoral, sendo ela ventrodorsal da pelve com os membros pélvicos estendidos simetricamente e levemente rotacionados medialmente, para centralizar as patelas sobre os sulcos trocleares (**Figura 6**).

As imagens foram avaliadas quanto à congruência radiográfica entre a cabeça do fêmur e o acetábulo, sinais de osteoartrite, grau de luxação ou subluxação e quanto ao ângulo de Norberg. Sendo feitas com intervalo de 18 dias entre uma aplicação e outra.



Figura 6. Posicionamento radiográfico para o diagnóstico de DCF. A: Incidência ventrodorsal da articulação coxofemoral; B: Radiografia de articulação do coxal sem displasia, onde se observa ausência de alterações radiográficas; C: Radiografia de articulação do coxal com DCF, onde observa-se luxação bilateral. Fonte: Ortopet.

4.1.2 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO

Além do RX, os animais também foram submetidos à ultrassonografia da articulação do coxal feitos em média com intervalos de aproximadamente 18 dias entre uma aplicação e outra, a fim de avaliar as condições morfológicas das cartilagens da articulação do coxal.

4.1.3 COLHEITA DE SANGUE VENOSO E DE URINA

Foram colhidos 2 ml de sangue da veia cefálica para realização de exames laboratoriais de rotina como hemograma e bioquímica sérica para análise de função renal (ureia e creatinina) e hepática (fosfatase alcalina e alanina aminotransferase). Também foi colhido 10 ml de urina por cateterização vesical e/ou cistocentese, para realização de urinálise, no intuito de avaliar as condições clínicas reais dos pacientes e descartar animais com enfermidades associadas à DCF.

4.1.4 COLHEITA DE TECIDO ADIPOSEO

Após tricotomia, sob anestesia geral os animais foram colocados em decúbito lateral e após antissepsia com clorexidina a 2% e álcool 70%, foi realizada incisão de aproximadamente 2 cm na pele na região de um dos flancos, seguido de divulsão do tecido subcutâneo e colheita de uma amostra de tecido adiposo, também de aproximadamente 2 cm de extensão.

O material foi acondicionado em meio de cultivo adequado e transportado ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CTMs

4.2.1 ISOLAMENTO, CULTIVO, VIABILIDADE E MORFOLOGIA CELULAR

Para o isolamento celular a gordura foi colocada em uma placa de Petri, lavada com Hanks e macerada. Em seguida foi colocada em um tubo cônico adicionando-se colagenase, sendo deixado por uma hora em estufa a 37°C, com 5% de CO². Para inativar a ação da colagenase foi feita suplementação com 20 % de SFB e após a inativação o material foi homogeneizado e centrifugado durante 10 minutos a 1000 rpm, isolando as células no fundo do tubo e adicionando-se 5 ml de meio no tubo, homogeneizando e transferindo-se as células para garrafas de cultura devidamente identificadas, que foram mantidas em estufa para cultivo.

O teste de viabilidade foi feito com corante Tripan, sendo tirado o meio da garrafa, lavada com meio de cultivo Hanks e adicionado 1 ml de tripsina. Em seguida foram adicionados 10 ml do mesmo meio de cultivo, para inativação enzimática, homogeneizado, passado para um tubo cônico, sendo centrifugado por 10 min a 1000 rpm, O sobrenadante foi descartado e adicionado 10 ml de solução fisiológica para lavar as células, homogeneizando e centrifugando por 5 min a 2000 rpm. O *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de soro, com pipeta de 10 µl, sendo retirado 10 µl das células e mais 10 µl de azul de Tripan em um microtubo. Em seguida a amostra foi homogeneizada e retirado 10 µl, os quais foram acrescidos em câmara de Neubauer, a fim de realizar contagem celular. Por fim foi utilizado o cálculo de viabilidade, sendo contabilizado o número de células viáveis e de células não viáveis. Durante a contagem foi observado também a morfologia celular.

4.2.2 IMUNOFENOTIPAGEM

As técnicas relacionadas à imunocitoquímica foram realizadas junto ao Laboratório de Células-tronco na Universidade de São Paulo- USP.

Esta análise foi efetivada com anticorpos específicos de membrana de célula-tronco mesenquimais: anti-CD73, Vimentina e anti-CD105 como marcadores positivos de CTMs e CD34 e CD45 como marcadores negativos.

O cultivo foi feito em placa de 24 poços (10^4 células/ ml), em DMEM-high glucose, suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% ATB (estreptomicina e penicilina). Após atingir 70% de confluência fixou-se com 100 μ L PFA 4% e incubou-se 30 minutos a 4°C. Após lavagens com PBS, as células foram permeabilizadas com Triton 0,1% por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas com PBS e adicionada Solução de Bloqueio (BSA 2%) durante 6 horas. Retirada à solução de bloqueio e adicionado **Anticorpo Primário** nas devidas diluições overnight (24h) a 4°C. No dia seguinte as células foram lavadas com PBS e incubadas com BSA 2% por 1h. Depois foram incubadas com **Anticorpo Secundário** (150 μ l diluído em BSA 2%) por 50 minutos. Lavadas com PBS novamente e adicionado DAPI (1:10.000), diluído em PBS, por 5 minutos. Lavadas com PBS e feita à montagem com Prolong (Life Technologies/ P36930). A leitura foi feita em microscópio de fluorescência Nikon 80i (4 campos diferentes).

4.2.3 RT-PCR

Para extração do RNA utilizou-se células em P8 empregando-se o Trizol Reagente (Life Technologies, CA). O cDNA foi realizado usando SuperScript III First-Strand (Invitrogen), sendo ambos os protocolos realizados de acordo descrição dos fabricantes.

O cDNA obtido da extração de RNA foi submetido a PCR quantitativa (qPCR) utilizando SYBR green Supermix (Bio-Rad). Cada amostra foi executada em triplicata. Os primers foram sintetizados para genes específicos (NANOG, OCT4, SOX2, CD105, CD44, CD90, CD29, CD45 e CD34) usando software Primer 3 (v. 0.4.0) ou disponível na Harvard Primer Banco online. As condições dos ciclos de PCR foram as seguintes: 2 minutos, 30 segundos a 95 ° C, 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C para 50 ciclos, seguidos por o protocolo de curva de fusão para verificar a especificidade de geração de ampliação. Todas as análises foram feitas por quantificação absoluta, relativa ao controle de gene GAPDH como referência, usando curvas padrão.

4.2.4 DIFERENCIAÇÃO

Todos os procedimentos relacionados à diferenciação celular foram executados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética da SAMAM / IEC. Até o momento as CTMTAs foram avaliadas quanto à capacidade de diferenciação *in vitro* para três linhagens celulares: osteócitos, condrócitos e adipogênica.

Para diferenciação osteogênica as células foram utilizadas em P5, plaqueadas na concentração de 5×10^3 células/ml em placa de 24 poços. Após dois dias o meio foi substituído pelo meio de indução de diferenciação osteogênica (STEMPRO Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), seguindo recomendações do fabricante, e mantendo-se o meio no controle negativo. O potencial de diferenciação osteogênica foi avaliado pela coloração com Alizarin Red S 2% por 5 min, após fixação com paraformoldeído 4% por 20 min.

Para diferenciação condrogênica as células foram utilizadas em P5, cultivadas em tubo cônico de 15 ml, na concentração $5,7 \times 10^7$. Após centrifugação o meio foi descartado e adicionado 5 ml de meio de indução de diferenciação condrogênica (STEMPRO Chondrogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), homogeneizado e centrifugado novamente. O tubo foi mantido em estufa a 37°C com 5% de CO_2 , trocando-se o meio de diferenciação a cada 48h por 21 dias, seguindo recomendações do fabricante. Posteriormente, o meio foi retirado e adicionado 2 ml de paraformaldeído a 4% para fixação da micromassa. Esta foi retirada do tubo para desidratação em diluições seriadas de etanol e embebição em blocos de parafina seguindo protocolo histológico de rotina, no entanto, ainda não efetuamos o processamento das lâminas histológicas.

Para diferenciação adipogênica, uma densidade de 10×10^3 células/poço (P8) foi cultivada em placa de 24 poços por 48 horas. Após este período o meio completo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação adipogênica (STEMPRO Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), trocado a cada 2 dias durante 14 dias, seguindo recomendações do fabricante, e mantendo-se no controle negativo o meio completo. O potencial de diferenciação adipogênica foi avaliado pela coloração com solução de Oil Red O 1,25% por 5 min, após fixação com paraformoldeído 4% por 1 hora à temperatura ambiente.

4.3 INFUSÃO DAS CTMs

As células-tronco mesenquimais CTMs foram administradas por infusões intra-articular na quantidade mínima de 1×10^6 , variando entre P1 a P5, através da cateterização do espaço intra-articular, com cateter intravenoso LABOR IMPORT, Nº 18 e guiada com o auxílio de ultrassonografia articular (**Figura 6**). Foram realizadas 2 infusões em cada paciente selecionado, com volume de 0,5 ml de NaCl, com intervalo de aproximadamente 20 dias, precedidas de colheita de sangue e urina para análises clínicas e radiografia e ultrassonografia articular de controle.

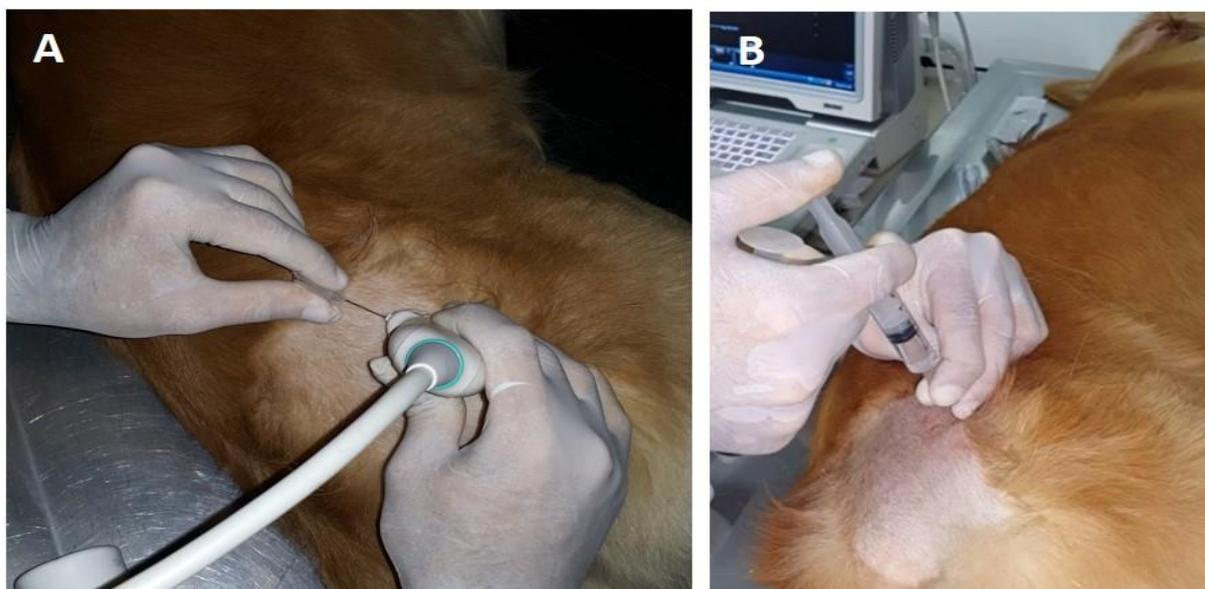


Figura 7. Infusão das CTMs intra-articular. A: Exame ultrassonográfico para localização do espaço intra-articular coxofemoral em canino portador de displasia coxofemoral; B: Aplicação das CTMs diretamente no espaço intra-articular.

4. 12 AVALIAÇÃO APÓS INFUSÃO DAS CTMs

As avaliações dos sinais clínicos foram realizadas semanalmente após cada infusão de CTMs, por exame clínico e ortopédico documentado, ultrassonografia de superfície articular e radiografia da articulação do coxal.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CTMTA

5.1.1 CULTIVO, EXPANSÃO E MORFOLOGIA

Todas as amostras utilizadas apresentaram como característica comum, adesão à superfície plástica e morfologia fibroblastoide em 24 horas e permaneceram em cultivo primário por aproximadamente 7 dias, quando alcançaram confluência de 95% (**Figura 8**), realizando em seguida os repiques que variaram de P1 e P5.

Foram observadas alterações na morfologia celular entre as passagens iniciais e as mais tardias. Entretanto, em ambas as passagens as CTM apresentaram morfologia semelhante a fibroblasto. Porém, em P0 as células apresentaram tamanho menor quando comparadas com o tamanho de P5.

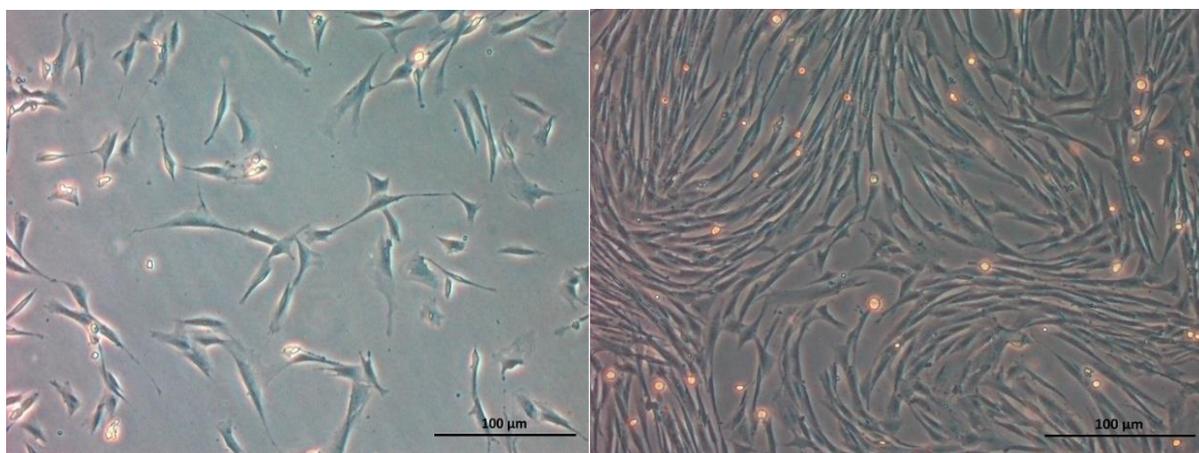


Figura 8. Fotomicroscopia de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de cão em cultivo *in vitro*. A: Células em P0 com 24 horas de cultivo apresentando morfologia semelhante a fibroblasto; B: Células em P0 após 7 dias de cultivo, apresentando confluência de 95%. Barra de escala: 100 µm.

5.1.2 VIABILIDADE

A viabilidade das células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo dos pacientes selecionados foram testadas antes de cada infusão, onde em cd1, em cultivo, após criopreservação obtiveram viabilidade de 73,68% em P2 e 75% em P3 (**Tabela 2**). Enquanto que as células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo de cd2, em cultivo, após criopreservação obtiveram viabilidade de 94,00% em P1 e 83,00% em P2 (**Tabela 3**). Em células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo de cd3, em cultivo, após criopreservação obtiveram viabilidade de 95,00% em P5 e 80,00% em P2 (**Tabela 4**). Em células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo de cd4, em cultivo, após criopreservação obtiveram viabilidade de 87,00% em P2 e 75,00% em P5 (**Tabela 5**).

Tabela 2. Viabilidade celular das infusões de CTM em cd1.

Viabilidade CD1	
(1) P2	73,68%
(2) P3	75,00%

Tabela 3. Viabilidade celular das infusões de CTM em cd2.

Viabilidade CD2	
(1) P1	94,00%
(2) P2	83,00%

Tabela 4. Viabilidade celular das infusões de CTM em cd3.

Viabilidade CD3	
(1) P5	95,00%
(2) P2	80,00%

Tabela 5. Viabilidade celular das infusões de CTM em cd4.

Viabilidade CD4	
(1) P2	87,00%
(2) P5	75, 00%

5. 1.3 IMUNOCITOQUÍMICA

A imunocitoquímica apresentou uma marcação positiva para anti-CD73, vimentina e anti-CD105, sendo marcadores específicos de células-tronco mesenquimais e marcação negativa para marcadores hematopoiéticos anti-CD34 e anti-CD45.

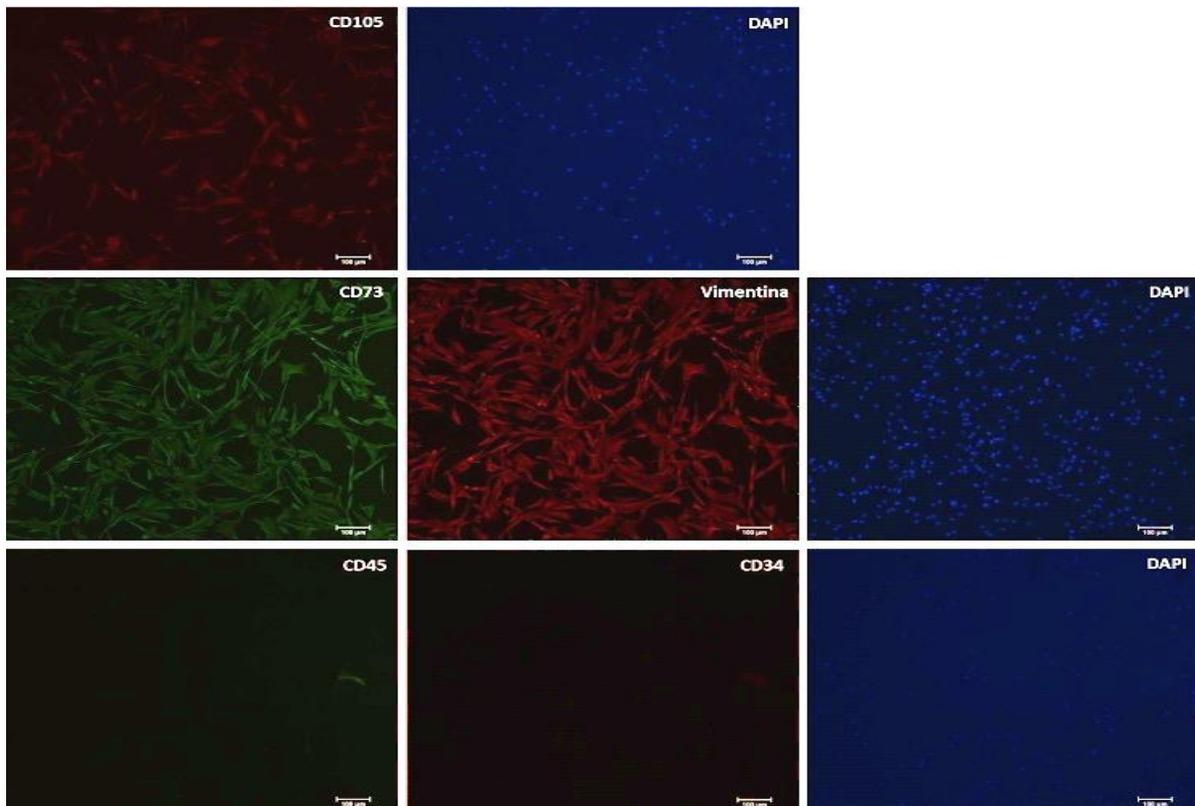


Figura 9. Fotomicroscopia de imunocitoquímica de CTM de cães em P4 com marcação positiva para anti-CD73, Vimentina e anti-CD105 e marcação negativa para anti-CD34 e anti-CD45,

evidenciando o núcleo celular corado pelo Dapi. Barra de escala: 100 μ m. Fonte: PINHEIRO, L. L. (2017).

5.1.4 RT-PCR

Quanto a expressão de marcadores mesenquimais do RT-PCR foi observada a expressão de CD44 e CD105, baixa expressão de CD34, ausência de expressão para CD45, bem como expressão gênica quantitativa dos genes relacionados à pluripotência (NANOG, OCT4 e SOX2) (**Figura 10**).

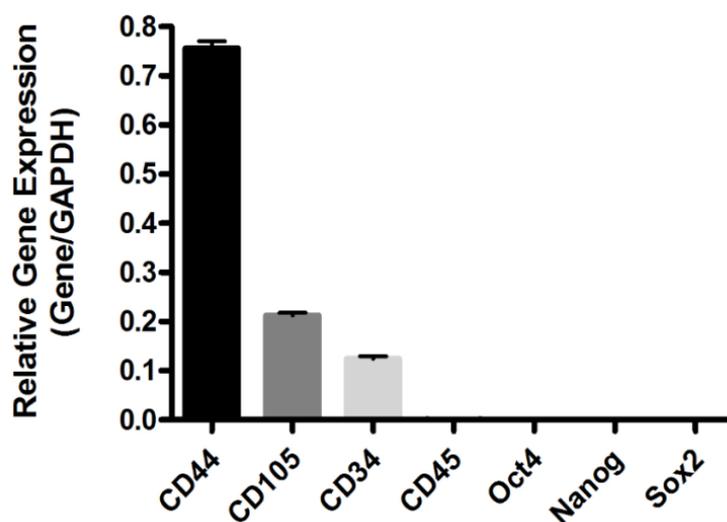


Figura 10. Resultado do RT-PCR de CTM em P8, com expressão para marcadores mesenquimais e baixa expressão para marcador hematopoiético, bem como ausência para CD45, Oct4, Nanog e Sox2. Fonte: PINHEIRO, L. L. (2017).

5.1.5 DIFERENCIAÇÃO

Seguindo protocolo do fabricante do meio de indução osteogênica, adipogênica e condrogênica as CTMs apresentaram características inerentes ao tecido ósseo quanto a formação de matriz extracelular de cálcio, as CTMs também apresentaram características de tecido adiposo quanto a formação de vacúolos de gordura e características de tecido

cartilaginosa devido a formação de matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos (**Figura 11**).

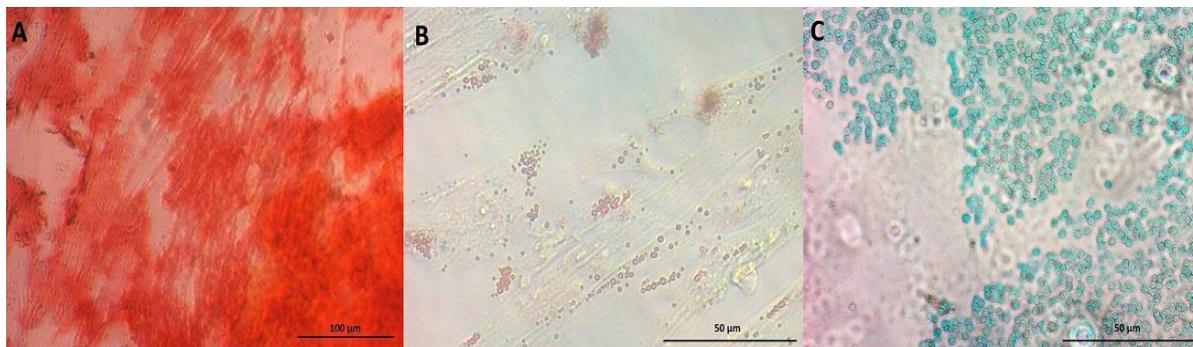


Figura 11. Diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica de CTMs. A: Evidenciando produção de matriz de cálcio extracelular pela coloração de Alizarin Red; B: Evidenciando produção de tecido adiposo pela coloração de OilRed; C: Evidenciando produção de matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos pela coloração de Alcian Blue. Barra de escala: 100 µm, 50 µm, 50 µm. Fonte: PINHEIRO, L. L. (2017).

5.2 RESULTADOS RADIOGRÁFICOS PÓS-INFUSÃO DE CTMs

O Exame radiográfico de articulação coxofemoral possibilitou a seleção de pacientes para o projeto, por meio do qual foi possível avaliar o grau de comprometimento articular e definir do ângulo de Norberg dos pacientes avaliados. No entanto, não foram observadas modificações nos padrões radiográficos observados em cd1 (**A**), cd2 (**B**), cd3 (**C**) e cd4 (**D**) (**Figura 12**) nos exames feitos durante a realização das infusões celulares.

Em cd1 foi diagnosticado DCF bilateral grau D e subluxação coxofemoral bilateral, em cd2 foi diagnosticado Displasia coxofemoral DCF bilateral grau D, subluxação coxofemoral bilateral e osteoartrose, em cd3 foi diagnosticado DCF bilateral grau C e em cd4 foi diagnosticado DCF bilateral grau B.

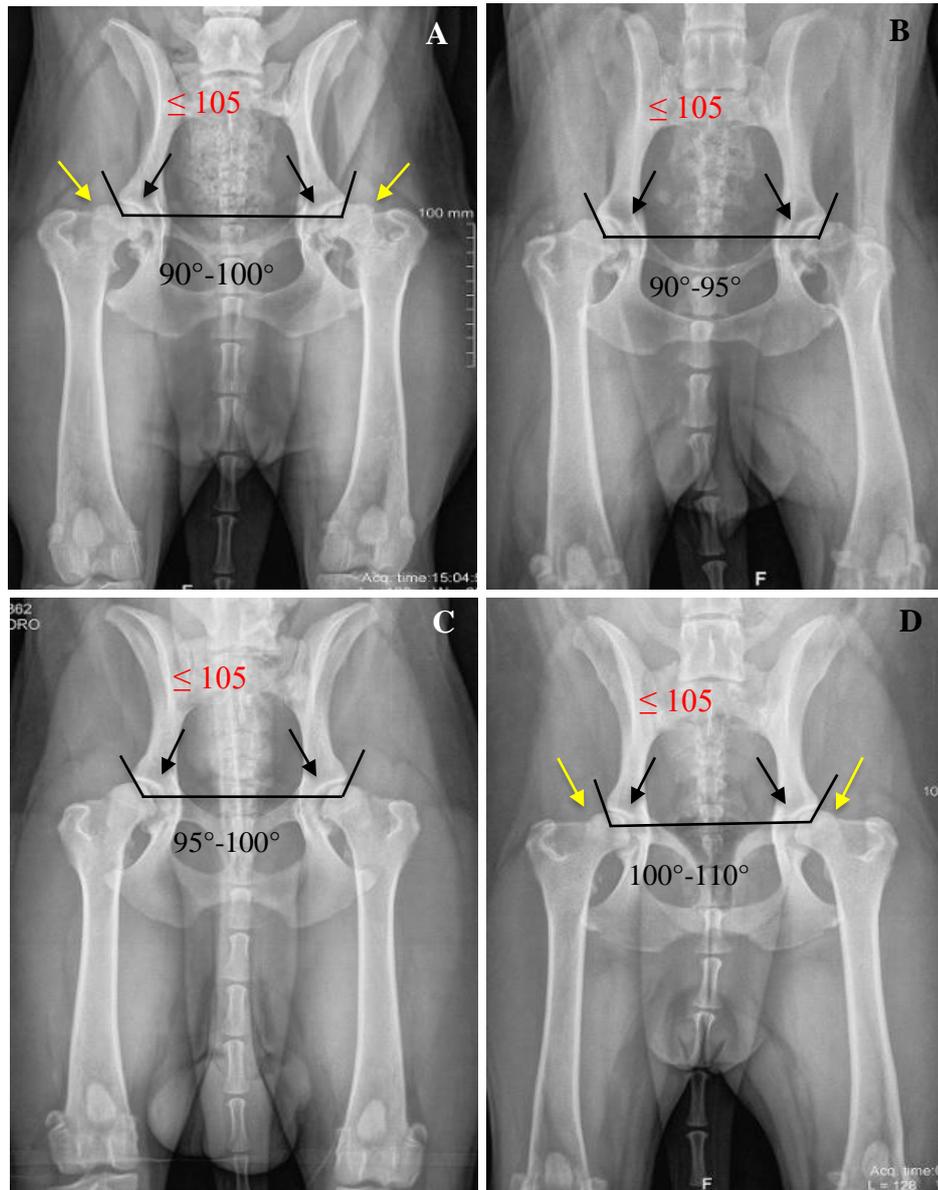


Figura 12. Radiografia da articulação do coxal dos pacientes cd1 (A), cd2 (B), cd3 (C) e cd4 (D) realizada antes da primeira infusão de CTMs. A: Articulações coxofemorais, cabeça femoral e superfície do acetábulo incongruentes (**seta preta**), ângulo de Norberg entre 90°-100°, colos femorais espessados (**seta amarela**). B: Articulações coxofemorais, cabeças femorais e superfícies dos acetábulos incongruentes (**seta preta**) e ângulo de Norberg entre 90°-95°. C: Articulações coxofemorais e superfícies acetabulares incongruentes (**seta preta**), ângulo de Norberg entre 95°-100°. D: Articulações coxofemorais congruentes (**seta preta**), ângulo de Norberg entre 100°- 110°, colos femorais discretamente espessados (**seta amarela**).

5.3 RESULTADOS ULTRASSONOGRÁFICOS PRÉ E PÓS-INFUSÃO DE CTM

O Exame ultrassonográfico da articulação coxofemoral possibilitou a avaliação morfológica das cartilagens dos pacientes avaliados. No entanto, não foram observadas modificações de superfície articular em cd1, cd2, cd3 e cd4, nos exames feitos durante a realização das infusões celulares.

Em cd1 foi observado em corte longitudinal a superfície da cabeça femoral esquerda e direita com aspecto irregular (**Figura 13**), cápsula articular preservada e esclerose óssea em superfície da cabeça do fêmur e acetábulo bilateralmente.

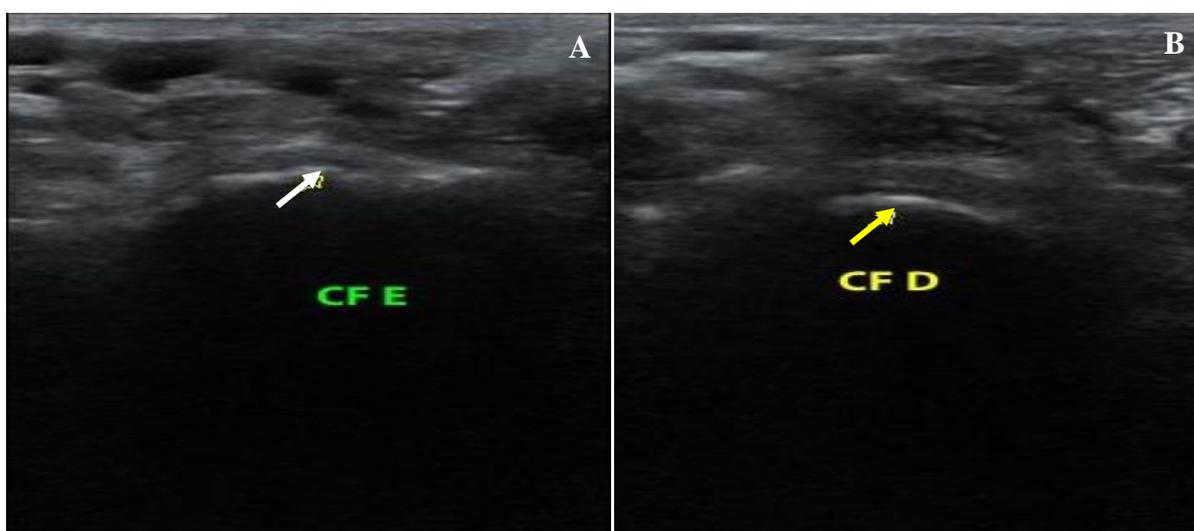


Figura 13. Imagem ultrassonográfica de articulação coxofemoral de cd1 com displasia coxofemoral realizada no dia da primeira infusão de CTMs. A: Observa-se irregularidade na superfície de cabeça femoral esquerda (**seta branca**) (CFE). B: Observa-se irregularidades na superfície articular de cabeça femoral direita (**seta amarela**) (CFD).

Em cd2 foi observado a superfície da cabeça femoral esquerda em corte longitudinal apresentando discreto aumento da região da cápsula articular devido a presença de líquido e osteoartrite/osteoartrose da articulação coxofemoral esquerda. Entre as intercorrências foi observado um sangramento na área articular durante a segunda infusão causada pela introdução do cateter durante a infusão (**Figura 14**). Em cd3 foi observado a superfície da cabeça femoral esquerda e direita em corte longitudinal apresentam aspecto discretamente irregular, cápsula articular preservada e osteoartrose leve (**Figura 15**).

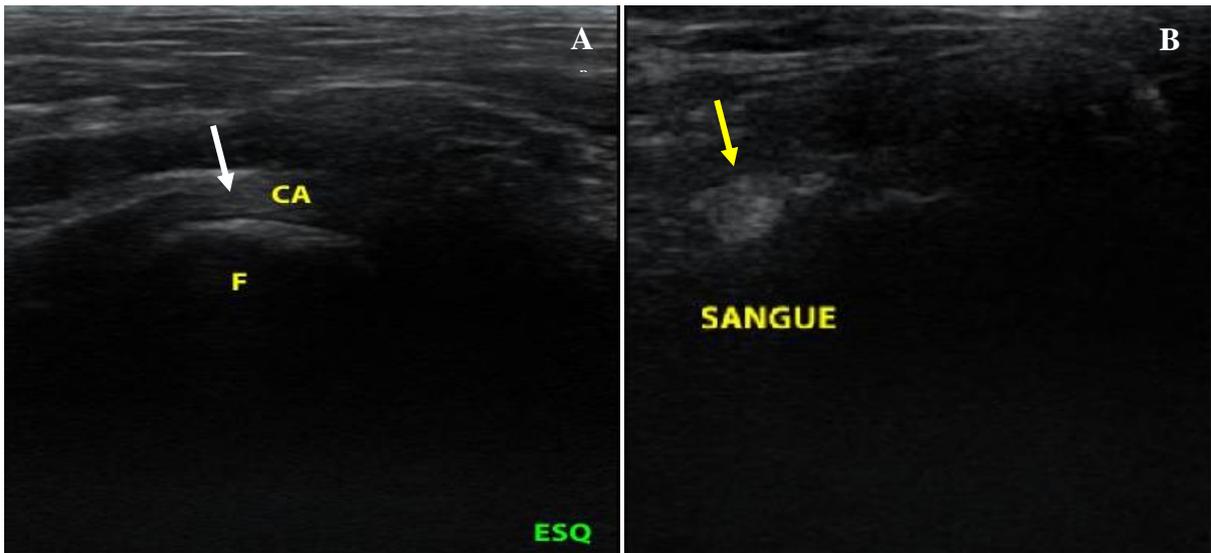


Figura 14. Imagem ultrassonográfica de articulação coxofemoral de cd2 com displasia coxofemoral, realizada no dia da primeira infusão de CTMs. A: Observa-se irregularidade na superfície de cabeça femoral esquerda (seta branca) (CFE). B: Observa-se sangramento em área articular de cabeça femoral direita (seta amarela) (CFD).

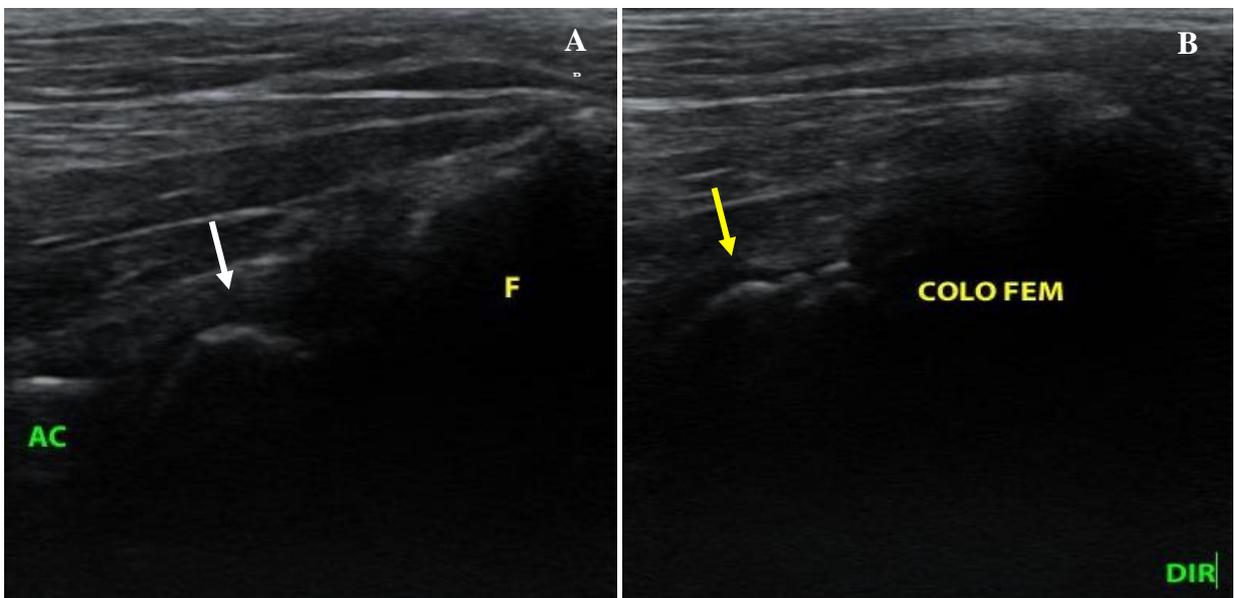


Figura 15. Imagem ultrassonográfica de articulação coxofemoral de cd3 com displasia coxofemoral realizada no dia da primeira infusão de CTMs. A: Observa-se irregularidade na superfície de cabeça femoral esquerda (seta branca) (CFE). B: Observa-se irregularidades na superfície articular de cabeça femoral direita (seta amarela) (CFD).

Em cd4 foi observado superfície da cabeça femoral esquerda e direita em corte longitudinal apresentam aspecto regular, cápsula articular preservada, sem sinais de alterações **(Figura 16)**.

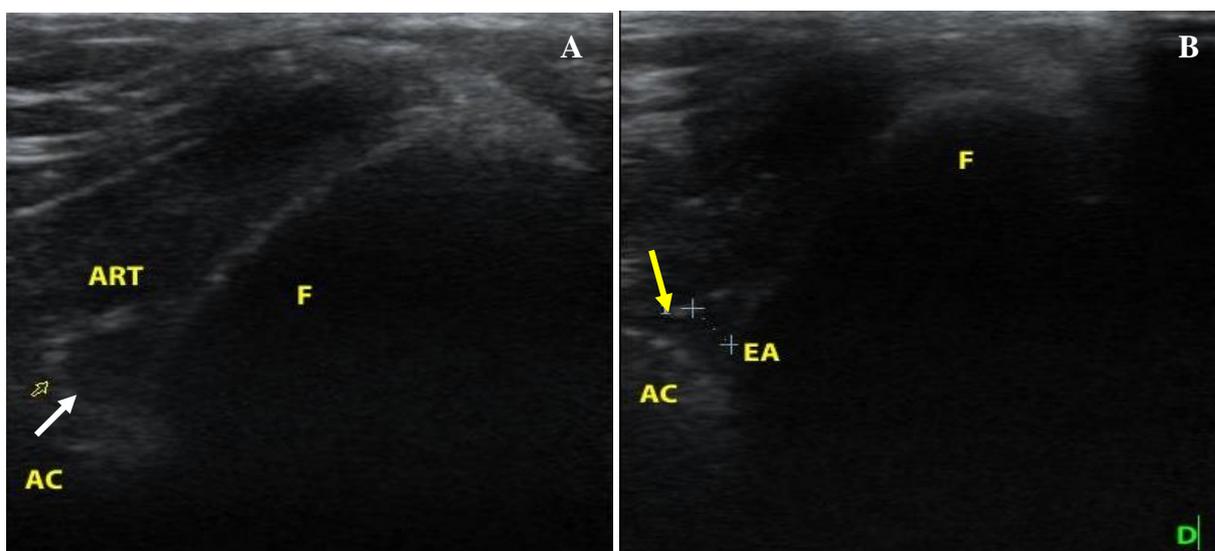


Figura 16. Imagem ultrassonográfica de articulação coxofemoral de cd4 com displasia coxofemoral realizada no dia da primeira infusão de CTM. A: Observa-se ausência de irregularidade em superfície de cabeça femoral esquerda (**seta branca**) (CFE). B: Observa-se ausência de irregularidade em superfície de cabeça femoral direita (**seta amarela**) (CFD).

5.4 AVALIAÇÃO VISUAL DO PACIENTE APÓS INFUSÕES

Após a avaliação visual dos pacientes 50% concordaram plenamente e 50% discordaram totalmente quanto alterações na marcha normal após a primeira infusão. Quanto a presença de claudicação uni ou bilaterais 25% concordaram plenamente e 75% discordaram totalmente quanto a presença. Quanto a presença da simetria muscular 75% concordaram plenamente e 25% discordaram totalmente. Quanto a presença da assimetria unilateral 25% concordam plenamente e 75% discordaram totalmente. Quanto a presença da assimetria bilateralmente 100% discordaram totalmente. Quanto a presença de luxação uni ou bilateral 100 % discordaram totalmente e quanto a melhora clínica 75% concordaram plenamente e 25% concordaram parcialmente **(Figura 17)**.

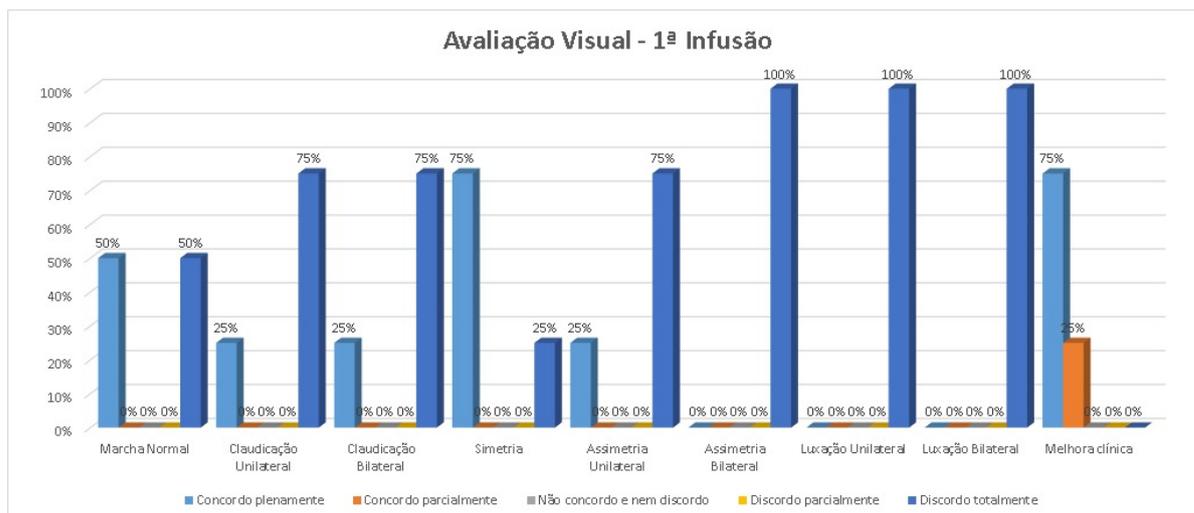


Figura 17. Avaliação visual dos tutores quanto a presença dos sinais clínicos de DCF após a primeira infusão dos pacientes inclusos no estudo.

Após a avaliação visual da segunda infusão 50% dos pacientes concordaram plenamente e 50% discordaram total quanto a alterações na marcha após a segunda infusão. Quanto à presença de claudicação unilateral 25% concordaram plenamente e 75% discordaram totalmente. Quanto à presença de claudicação bilateral 25% concordaram plenamente e 75% discordaram totalmente. Quanto à presença de simetria muscular 75% concordaram plenamente e 25% discordaram totalmente. Quanto à presença de assimetria unilateral 25% concordam plenamente e 75% discordaram totalmente. Quanto à presença de assimetria bilateralmente 100% discordaram totalmente. Quanto a presença de luxação uni ou bilateral 100 % discordaram totalmente e quanto a melhora clínica 75% concordaram plenamente e 25% concordaram parcialmente (**Figura 18**).

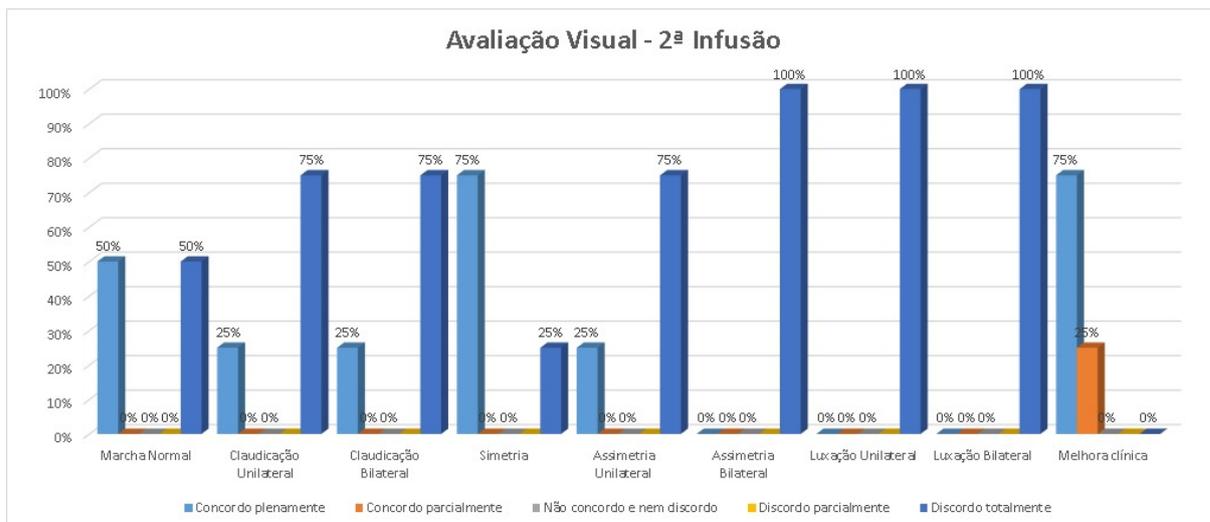


Figura18: Avaliação visual dos tutores quanto a presença dos sinais clínicos de DCF após a segunda infusão dos pacientes incluídos no estudo.

5.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA ARTICULAÇÃO DO COXAL

Após a avaliação clínica 50% dos pacientes concordaram plenamente e 50% discordaram totalmente quanto a presença do sinal clínico de dor no membro após a primeira infusão. Quanto à presença de simetria a extensão dos membros 50% concordaram plenamente e 50% discordaram totalmente quanto a presença. Quanto à presença de assimetria dos membros a extensão 25% concordaram plenamente e 75% discordaram totalmente. Quanto à presença de crepitação do membro durante a movimentação 25% concordaram plenamente e 75% discordaram totalmente. Quanto ao sinal de Ortolani 100% discordaram totalmente quanto a sua presença (**Figura 19**).

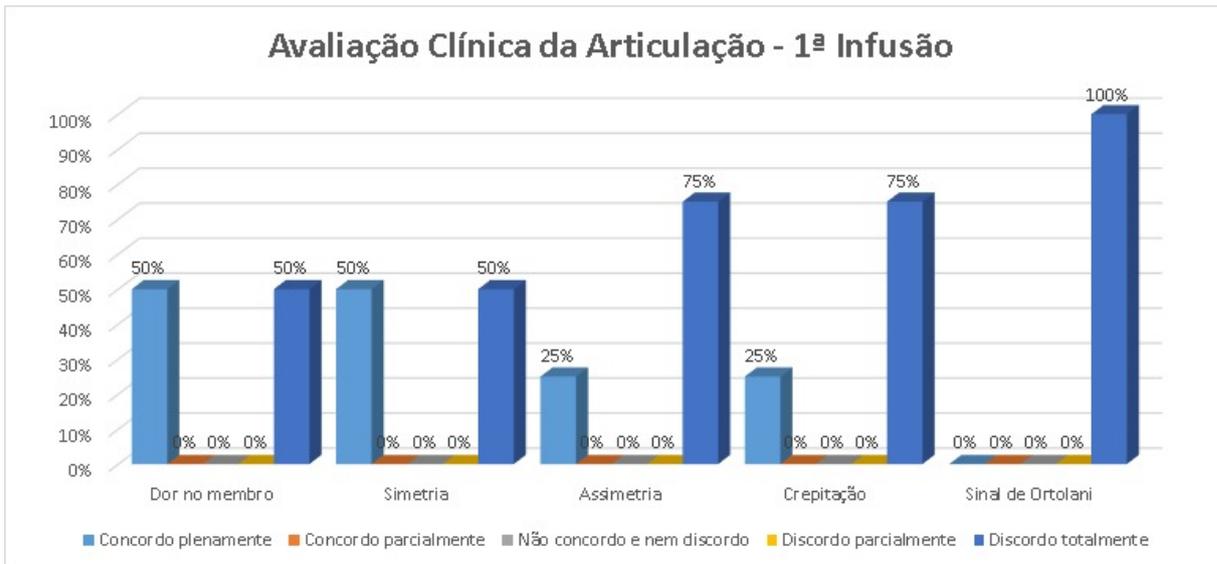


Figura19. Avaliação clínica articular quanto a presença dos sinais clínicos característicos da doença após a primeira infusão dos pacientes inclusos no estudo.

Após a avaliação clínica 75% dos pacientes concordaram plenamente e 25% discordaram totalmente quanto a presença de dor no membro após a segunda infusão. Quanto à presença de simetria a extensão dos membros 50% concordaram plenamente e 50% discordaram totalmente quanto a sua presença. Quanto à presença de assimetria dos membros a extensão 25% concordaram plenamente e 75% discordaram totalmente. Quando à presença de crepitação do membro durante a movimentação 25% concordaram plenamente e 75% discordaram totalmente. Quanto ao sinal de Ortolani 100% discordaram totalmente quanto a sua presença (**Figura 20**).

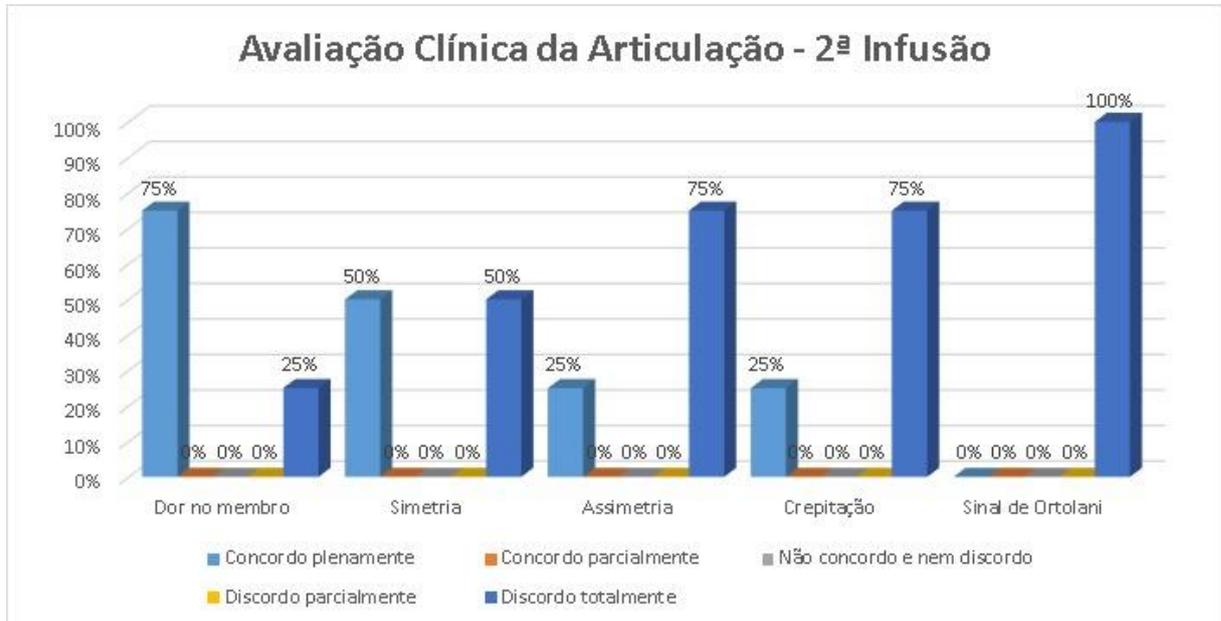


Figura 20. Avaliação clínica articular quanto a presença dos sinais clínicos característicos da doença após a segunda infusão dos pacientes incluídos no estudo.

6 DISCUSSÃO

Durante a seleção dos pacientes nem todos os animais avaliados apresentaram inicialmente sinais clínicos compatíveis com DCF. Entretanto, os indivíduos acometidos pela doença frequentemente são apresentados para avaliação quando os sinais clínicos estão mais graves (DASSLER, 2007), principalmente por causa de claudicação após atividade física (FOSSUM, 2014).

Visando esclarecer as condições estruturais das articulações do coxal de cada paciente e garantir que os animais selecionados fossem de fato portadores de DCF, realizamos RX das referidas articulações, sendo avaliadas alterações morfológicas e mensurando-se o deslocamento da cabeça do fêmur em relação ao acetábulo, conforme descrito por Morgan *et al*, (2000).

A partir da técnica radiográfica aplicada, qualquer medida inferior a 105° mostra uma relação inadequada entre a cabeça do fêmur e o acetábulo, demonstrando subluxação ou luxação do membro (DOUGLAS & WILLIAMSON, 1975). Todavia, essa mensuração é questionada por alguns autores, devido a sua baixa especificidade (CULP *et al*, 2006), fato que ficou evidente quando comparamos as imagens radiográficas de antes e depois das infusões celulares, no qual não foram observadas variações morfológicas na superfície articular em exames radiográficos, bem como nos exames ultrassonográficos.

De forma geral, como achado radiográfico observamos incongruência articular, espessamento do colo femoral e variações no ângulo de Norberg, constituindo algumas das alterações encontradas no RX de animais displásicos, conforme predito por DASSLER (2007), que acrescenta ainda, subluxação da cabeça do fêmur, sinais de doença articular degenerativa, presença de osteófitos, arrasamento do acetábulo, achatamento da cabeça femoral e espessamento do colo.

Após seleção dos pacientes por exame de RX, realizamos a extração de tecido adiposo para posterior isolamento celular, no qual optamos pela colheita direta na forma cirúrgica, por meio de incisão linear da pele e subcutâneo, pois além de ser mais prático, a literatura revela que a incisão em meia lua permite melhor obtenção do tecido adiposo (NIXON *et al*, 2008), ao contrário da aspiração conforme descrito por AWAD *et al*, (2003), SCHAFFLER & BUCHLER, (2007), BUNNELL *et al*, (2008).

Uma vez extraído o tecido adiposo de cada paciente, realizamos o isolamento das células-tronco mesenquimais por meio de digestão enzimática, no qual o tecido adiposo, após digerido pela ação da colagenase permitiu a obtenção de uma cultura em monocamada de células aderentes ao plástico, e com formato fibroblastoide, como descrito por DOMINICI *et al.*, (2006). Durante seu crescimento inicial *in vitro*, as CTMs demonstraram a capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade, conforme preconizado por DE UGARTE *et al.* (2003).

Estas células apresentaram viabilidades variando entre 73,68% e 95% no primeiro e segundo repique em todos os pacientes, no entanto, a literatura revela que em relação ao isolamento das CTMs alguns fatores podem interferir na viabilidade celular, como o tipo de procedimento cirúrgico utilizado e o método laboratorial empregado (GRONTHOS *et al.*, 2001; DE UGARTE *et al.*, 2003; PU *et al.*, 2006).

Seguindo os preceitos da Sociedade Internacional de Terapia Celular, as CTMs foram submetidas ao processo de diferenciação em tecido ósseo quanto a formação de matriz extracelular de cálcio, tecido adiposo quanto a formação de vacúolos de gordura e tecido cartilaginoso quanto a formação de matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos, como demonstrado *in vitro* por FISCHER *et al.*, (2002) e AWAD *et al.*, (2003). Toda via, é sabido que a diferenciação de CTMs também pode ocorrer no local da infusão, como já relatado em estudos de reparo cardíaco após infarto de miocárdio (KLEIN *et al.*, 2007; STRAUER *et al.*, 2015). Essa condição não foi possível de ser avaliada neste estudo, uma vez que seria necessário eutanasiar os animais para posterior avaliação histopatológica das articulações.

Analisando a expressão de marcadores mesenquimais por RT-PCR observamos expressão de CD44 e CD105, baixa expressão de CD34, ausência de expressão para CD45, bem como expressão gênica quantitativa dos genes relacionados à pluripotência (NANOG, OCT4 e SOX2), enquanto que a análise imunocitoquímica revelou expressão positiva para CD73, Vimentina e CD105, e expressão negativa para CD34 e CD45, seguindo o preconizado por BARRY *et al.*, (2004), KERN *et al.*, (2006), DOMINICI *et al.*, (2006) e KEATING, (2012). Acreditamos que essa baixa expressão de CD34 analisado por meio do RT-PCR possa ter se dado por meio de contaminação e erro de técnica, uma vez que na imunocitoquímica, tal marcador não foi expressado.

Uma vez com a certeza de se tratarem de CTMs, estas foram então infundidas via intra-articular na articulação do coxal de cada paciente. Após as infusões aplicação 50% dos animais apresentaram alteração na marcha, sendo um com claudicação unilateral e outro com claudicação bilateral, o que pode ser justificado pelo trauma causado durante as infusões. Tal

condição não se repetiu nas demais infusões, porém, chamou-nos atenção o fato de que durante a primeira e segunda infusão de CTMs, 25% dos pacientes apresentaram assimetria unilateral nos membros.

MORGAN (1986) considerou a manifestação assimétrica da DCF sob dois aspectos diferentes: unilateral, quando uma articulação é normal e a outra afetada, e bilateral, quando ambas as articulações estão afetadas, porém com graus diferentes, podendo se apresentar também com o mesmo grau de comprometimento durante a avaliação clínica da articulação do coxal.

Quanto a avaliação clínica articular obtivemos variações de 50% na primeira infusão e 75% na segunda quanto a presença de dor durante a manipulação dos membros pélvicos pós-infusão, mostrando que na segunda infusão aumentou o número de paciente apresentando a dor como sinal clínico. Segundo FERRIGNO *et al*, (2007) a dor, com consequente claudicação e impotência funcional dos membros pélvicos é causada inicialmente pela lassidão e instabilidade articulares, sendo observada frequentemente em animais jovens.

Quanto à presença de simetria a extensão dos membros 50% concordaram plenamente e 50% discordaram totalmente quanto a presença. Quanto à presença de assimetria dos membros a extensão 25% concordaram plenamente e 75% discordaram totalmente. Quanto à presença de crepitação dos membros durante a movimentação 25% concordaram e 75% discordaram. Em casos de maior comprometimento articular pode haver uma diminuição da amplitude de movimento da articulação do coxal, particularmente em extensão, e a presença de crepitação pode ser mais acentuada (DASSLER, 2006).

Quanto ao sinal de Ortolani 100% dos pacientes discordaram totalmente sobre a sua presença tanto na primeira quanto na segunda infusão. O sinal de Ortolani é raramente presente em cães velhos de porte grande em decorrência do arrasamento do acetábulo e fibrose da cápsula articular (PIERMATTEI *et al*, 2006). Pode haver uma diminuição da amplitude de movimento da articulação coxofemoral, particularmente em extensão, e a crepitação pode ser mais acentuada (DASSLER *et al*, 2003).

NOTH *et al* (2008) apontaram que injeções intra-articulares de CTMs são efetivas nos estágios iniciais das alterações, quando as lesões estão localizadas na superfície da cartilagem, no entanto foram utilizados pacientes com diferentes graus de comprometimento articular, onde foi obtido 75% de melhora clínica dentre os graus B, C e D, o que sugere que as CTMs podem ser efetivas em diferentes graus de desenvolvimento da doença.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a utilização das células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo podem ser utilizadas de forma segura quando infundidas por via intra-articular em caninos diagnosticados com displasia coxofemoral, se mostrando eficazes na melhora clínica desses pacientes. A terapia celular quando comparada a outras técnicas voltadas para o tratamento de displasia coxofemoral se mostrou menos invasiva que outras técnicas utilizadas como rotina para o tratamento da doença, pois ainda que presentes. O monitoramento desses pacientes com exames de imagem radiográficas e ultrassonográficas também se mostrou eficiente para o acompanhamento durante as infusões, no entanto possibilitou uma menor precisão na avaliação das superfícies articulares dos pacientes analisados.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, S.C. et al. Terapia celular nas doenças respiratórias. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2-4, p. 91-97, 2008.

ALEXANDER, J.W. The pathogenesis of canine hip dysplasia. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 22, n. 3, p. 503- 511, 1992.

ALVARENGA. J.; PEDRO, C. R. **Afecções da articulação coxofemoral**. In: MIKAIL, S.; PEDRO, C.R. 2. ed. **Fisioterapia Veterinária**. São Paulo: Editora Manole, p.121-129, 2006.

ALMEIDA, A.C.S.; Luxação Coxofemoral em Cães, **Biológicas**, v.1, n.2, p.7, 2008.

ALLAN, G. Radiographic Signs of Joint Disease In: THRALL, D.E. **Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology**, 4. ed., cap. 16, p. 187-207, 2002.

AMORIN, B.; VALIM, V. de S.; LEMOS, N.E.; JÚNIOR, L. M.; da SILVA, A. M. P.; da SILVA, M. A. L.; SILLA, L. Células-tronco mesenquimais - caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas. **Revista HCPA**, v. 32, n. 1, p. 71-81, 2012.

ANDERSON, A. Treatment of Hip Dysplasia. **The Journal of Small Animal Practice**. v. 52, p. 182-189, 2011.

AWAD, H.A.; HALVORSEN, Y.D.; GIMBLE, J.M.; GUILAK, F. Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. **Tissue Eng**. v.9, p. 1301-12, 2003.

BAUGÉ, C.; BOUMÉDIENE, K. Use of Adult Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering: Current Status and Future Developments, **Stem Cells International**, p.1-15, 2015.

BARRY FP, MURPHY JM. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*.36:568-8417, 2004.

BETTINI, C.M. et al. Incidência de displasia coxofemoral em cães da raça Border Collie. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoológicas**, v. 10, n. 1, p. 21-25, 2007.

BEYNEN, A.C. Nutraceuticals: Claims vs. evidence. In: **Anais of Production Symposium Trade Show** – Pet Food Forum, Chicago, p. 169-175, 2003.

BUNNELL, B.A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLI, C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. **Methods**, v.45, p. 115-20, 2008.

BRANCO, F.; REZENDE, P.; HOSHINO, R.; REAL, C. Tratamento de Displasia Coxofemoral Com Uso de Medicamento Homeopático. Trabalho apresentado como pôster no 5º Congresso de Homeopatia Veterinária, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2011.

BRINKMAN, D.M.; DE KLEER, I.M.; TEN CATE, R.; VAN ROSSUM, M.A.; BEKKERING, W.P.; FASTH, A. Autologous stem cell transplantation in children with severe progressive systemic or polyarticular juvenile idiopathic arthritis: long-term follow-up of a prospective clinical trial. **Arthritis Rheum**, v.56, p.2410-21, 2007.

BRINKER, W.O.; PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. Tratamento das luxações coxofemorais. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**, cap.15, p.394-433, 1999.

BLAU, H.M, BRAZELTON, T.R, WEIMANN, J.M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? **Cell**, v.105, n. 7, p. 829-41, 2001.

CARRION, M.J.M.; VENTURIN, G.T.; DACOSTA, J.C. Potencial terapêutico das células-tronco da medula óssea no tratamento da epilepsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 112-119, maio 2009.

CULP, W.T.N.; KAPATKIN, A. S.; GREGOR, T. P. et al. Evaluation of the Norberg angle threshold: a comparison of Norberg angle and distraction index as measures of coxofemoral degenerative joint disease susceptibility in seven breeds of dogs. **Veterinary Surgery**, v.35, n.5, p.453-9, 2006.

DASSLER, D.L. Canine hip dysplasia: diagnosis and nonsurgical treatment. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 3^a ed. Philadelphia: Saunders, v.2, p.2019- 29, 2003.

DASSLER, C.L. Displasia do Quadril Canino: Diagnóstico e Tratamento Não Cirúrgico. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, v. 2, cap.144, p. 2019-2029, 2007.

DAZZI, F.; VAN LAAR, J.M.; COPE, A.; TYNDALL, A. Cell therapy for autoimmune diseases. **Arthritis Res Ther**, v. 9, p.206, 2007.

DEJARDIN, L.M.; SCHULZ, K.S. Tratamento Cirúrgico da Displasia Coxofemoral Canina. In: SLATTER, Douglas. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, p. 2029-2059, 2007.

DENNY, H.R.; BUTTERWORTH, S.J. **Cirurgia Ortopédica em Cães e Gatos**. 4. ed. São Paulo: Roca, cap. 40, p. 352-382, 2006.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p. 315-317, 2006.

DOUGLAS, S.W.; WILLIAMSON, H.D. Diagnóstico radiológico veterinário. In: **Diagnóstico radiológico veterinário**. Zaragoza: Acribia, 330p, 1975.

DYCE, K.M. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap 17, p. 490-500, 2010.

DE UGARTE DA, MORIZONO K, ELBARBARY A, ALFONSO Z, ZUK PA, ZHU M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**.174:101-9, 2003.

FERREIRA, M.P.; ALIEVI, M.M.; GOMES, C.; BECK, C.A.C.; VOLL, J.; SAI, D.; FILHO, A.P.; FREIRE, C.D. Acetabuloplastia extracapsular para tratamento de displasia coxofemoral em cão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p. 101-104, 2007.

FERRIGNO, C.R.A. Denervação acetabular cranial e dorsal no tratamento da displasia coxofemoral em cães: 360 dias de evolução de 97 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 27, n. 8, p. 333-340, 2007.

FERRIGNO, C.R.A.; DAVILA, R.S.; YAMAMOTO, E.Y.; YAZBEK, K.V.B.; FERRAZ, V.C.M. Estudo da técnica de denervação da cápsula articular coxofemoral no tratamento da dor em cães com displasia coxofemoral: resultados preliminares. *Cirurgia de Pequenos Animais, Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, p. 169-170, 2004.

FERRIGNO, C.R.A. et al. Denervação acetabular cranial e dorsal no tratamento da displasia coxofemoral em cães: 360 dias de evolução de 97 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n.8, p. 333-340, 2007.

FISCHER P, MOLLER P, BINDL L, MELZNER I, TORNQVIST H, DEBATIN KM, et al. Induction of Adipocyte Differentiation by a Thiazolidinedione in Cultured, Subepidermal Fibroblast-Like Cells of an Infant with Congenital Generalized Lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*.87:2384-90, 2002.

FODOR, W.L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, n. 102, 2003.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1640, 2014.

FROES, T.R.; GARCIA, D.A.A.; SCHMIDLIM, P.C.; PARCHEN, H.D.; SOUZA, A.C.R. Estudo comparativo e análise interobservador entre dois métodos de avaliação da displasia coxofemoral de cães. **Archives of Veterinary Science**, v.14, n.4, p.187-197, 2009.

GINJA M. M. D. Comparison of clinical, radiographic, computed tomographic and magnetic resonance imaging methods for early prediction of canine hip dysplasia. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 50, n. 1, p. 135–143. 2014.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1134, 1986.

GENUÍNO, P. C. **Parâmetros radiográficos de displasia coxofemoral na raça Rottweiler.** 31 f. Dissertação de mestrado em Ciência Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

GOMES, D. **Células-tronco embrionárias: implicações bioéticas e jurídicas.** Bioethikos-Centro Universitário São Camilo, v. 1, n. 2, p. 78-87, 2007.

HAUPTMAN, J.H. The hip joint. In: SLATTER, D.H., **Textbook of small animal surgery.** Philadelphia, W.B. Saunders, p. 2153-79, 1985.

HENROTIN Y. et al. Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: Present and future perspectives. **Veterinary Journal**, v. 170, p. 113-123, 2005.

HULSE, D.A.; JOHNSON, A.L. Tratamento da doença articular. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais.** São Paulo: Roca, p.1042-1050, 2002.

KAPATKIN A.S.; TOMASIC M.; BEECH J.; MEADOWS C.; BOSTON R. C.; MAYHEW, P.D.; POWERS M.Y. & SMITH G.K. Effects of electro stimulated acupuncture on ground reaction forces and pain scores in dogs with chronic elbow joint arthritis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 228, n. 9. p.1350-1354, 2006.

KEATING, A. Mesenchymal Stromal Cells: New Directions. **Cell Stem Cell.** V. 20, p. 709-716, 2012.

KERN S, EICHLER H, STOEVE J, KLUTER H, BIEBACK K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells.**24:1294-301, 2006.

KINZEL S.; HEIN S.; SCHEVEN C.; VON & KÜPPER W. 10 years experience with denervation of the hip joint capsule in the treatment of canine hip joint dysplasia and arthrosis. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 115, p. 53- 56, 2002.

KLEIN HM, GHODSIZAD A, MARKTANNER R, POLL L, VOELKEL T, MOHAMMAD HASANI MR, *et al.* Intramyocardial implantation of CD133+ stem cells improved cardiac function without by-pass surgery. *Heart Surg Forum.* 2007;10(1):E66-9

LUST, G. An overview of the pathogenesis of canine hip dysplasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*,v.210, p.1443-1445, 1997.

KEALY, J.K.; MACALLISTER, H. **Diagnostic radiology and ultrasonography of the dog and cat.** St. Louis: Elsevier Saunders, p. 512, 2015.

LEMISCHKA I.R. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci.* V. 1044, p. 132-8, 2005.

LIEBICH, H.G. et al. Membros Pélvicos ou Posteriores. In: KÖNIG, H. E. *et al.* **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 4, p. 235-296, 2011.

LUST, G.; WILLIAN. A.J.; WURSTER, N.B. Joint laxity and its association with hip dysplasia in Labrador retrievers. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p. 1990-1999, 1993.

LUST, G.; BEILMAN, W.T.; RENDANO, V.T. A relationship between degree of çaxity and synovial fluid volume in coxofemoral joints of dogs predisposed for hip dysplasia. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, n.1, p.55-60, 1980.

LUST, G.; RENDANO, V.T.; SUMMERS, B.A. Canine hip dysplasia: concepts and diagnosis. *J. Ame. Vet. Med. Assoc.* v. 187, n. 6, p. 636-640, 1985.

MARSCHALL, Y.; DISTL, O. Mapping quantitative trait loci for canine hip dysplasia in German Shepherd dogs. *Mam. Gen.*, v.18, p.861-870, 2007.

MATIS, U. **Hip Dysplasia therapy.** WSAVA/FECAVA/Voorjaarsdagen World Congress., Amsterdam, p.383-84, 2000.

MADSEN, J.S. The joint capsule and joint laxity in dogs with hip dysplasia. **J. Ame. Vet. Med. Assoc.**, v.210, p. 1463-1465, 1997.

MANLEY, P.A. Articulação Coxofemoral. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2nd ed. São Paulo: Manole, v. 2, cap. 135. p. 2113-2133, 1998.

MILLER, M.E; CHRISTENSEN, G.C.(Ed.) **Anatomy of the dog. Philadelphia: W.B. Saunders**, p.941, 1974.

MINTO, B.W.; KAWAMOTO, F.Y.K.; FARIA, L.G. Displasia Coxofemoral. In: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; DE NARDI, A.B.; ROZA, M.R. **PROMEVET Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária: Ciclo 2**. Porto Alegre: Artmed Panamericana, v. 1, p. 9-48, 2006.

MINTO B.W. et al. 2012. Avaliação clínica da denervação acetabular em cães com displasia coxofemoral atendidos no hospital veterinário da FMVZ – Botucatu – SP. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.1, p.91-8, 2012.

MORGAN JP, WIND A, DAVIDSON AP. Hip dysplasia. In: Hereditary bone and joint diseases in the dog. Hannover: Schlütersche, p.109-208, 2000.

MORGAN, J.P. Canine hip dysplasia: asymmetry of change. *Calif. Vet.*, v.40, p.17-20, 1986.

MONTEIRO, B.S.; ARGOLO, N.; N. M.; DEL C. R. J. Células-tronco mesenquimais. **Revista Ciência Rural**, v.40, p.200-208, 2010.

MCLAUGHLIN, R.M. Displasia coxofemoral em cães. In: TILLEY, L.P.; SMITH JR, F.W.K. **Consulta Veterinária em 5 Minutos. Espécies canina e felina**. 2. ed. São Paulo: Editora Manole, p.796-797, 2003.

NISSHIKAWA, S.I.; GOLDSTEIN, R.A.; NIERRAS, C.R. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 725-729, 2009.

NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J. L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L. Effect of adiposederived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.69, p.928–937, 2008.

NOGUEIRA, S.R.; ROCHA, L.B.; TUDURY, E.A. Utilização do índice de distração no diagnóstico da displasia coxofemoral canina. **Clínica Veterinária**, v.10, n.54, p.28-42, 2005.

ODORICO J.S.; KAUFMAN D.S.; THOMSON J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells.**, v. 19, n. 3, p.193-204, 2001.

OLMSTEAD, M. L. Disorders of the coxofemoral joint. In: BICHARD, S. J.; SCHERDING, R. G. **Saunders manual of small animal practice**. Ed 3, p.1115- 1122, 2003.

PASTER, E.R.; LAFOND, E.; BIERY, D.N. Estimates of prevalence of hip dysplasia in Golden Retrievers and Rottweilers and the influence of bias on published prevalence figures. **J. Ame.Vet. Med. Assoc**, v. 226, p. 387-392, 2005.

PIERMATTEI, D.L. *et al.* **Ortopedia e tratamento de fraturas de pequenos animais**. 4. ed. São Paulo: Manole, cap. 16, p. 523-579, 2009.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.; DECAMP, C. The hip joint. In: Brinker, Piermattei and Flo's handbook of small animal orthopedics and fracture repair. 4^a ed. Philadelphia: Saunders, p.461-511, 2006.

PERRUPATO, T.F.; QUIRINO A.C.T, Acupuntura como terapia complementar no tratamento de displasia coxofemoral em cães - relato de caso, **Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.**, v. 1, n. 2, p. 141-145, 2014.

PU LLQ, XIANGDONG C, FINK BF, DAYONG G, VASCONEZ HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. **Plast Reconstr Surg**.117:1845-50, 2006.

RAWSON, E. A. et al. Simultaneous bilateral femoral head and neck ostectomy for the treatment of canine hip dysplasia. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.41, p.166-170, 2005.

RETTENMAIER, J.L.; KELLER, G.G.; LATTIMER, J.C. et al. Prevalence of canine hip dysplasia in a veterinary teaching hospital population. **Vet. Rad.Ultras.**, v.43, p. 313-318, 2002.

REMEDIOS, A.M.; FRIES, C.L. The pathogenesis and diagnosis of canine hip dysplasia: a review. **Can. Vet. J.**, v.36, p.494- 502, 1995.

ROCHA F.P.C. et al Displasia coxofemoral em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 4, n. 11, p. 1-7, 2008.

RISER, W.H. **The dog as model for the study of hip dysplasia:** Some aspects of growth, form, and development of the normal and dysplastic hip joint. *J.Vet. Pathol.*, v.12, n.4, p.229-334, 1975.

SCHAFFLER, A, BUCHLER, C. CONCISE Review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem Cells**, v. 25, p. 818-27, 2007.

SCHAFFLER A, BUCHLER C. Concise Review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25:818-27. Bunnell BA, Flaath M, Gagliardi C, Patel B, Ripoli C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*.45:115-20, 2008.

SALGADO, A.J, REIS, R.L, SOUSA, N.J., GIMBLE, J.M. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 5, p. 103-10, 2010.

SANTANA L.A. Avaliação radiográfica de cães com displasia coxofemoral tratados pela sinfisiodese pública. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.5, p. 1102-1108, 2010.

SCHOENECKER, P. L.; LESKER, P. A.; OGATA, K. A dynamics canine modelo f experimental hip dysplasia. **J. Bone Joint surg.**, v. 66, n.8, p.1281-8, 1984.

SOUZA, A.F.A.; TUDURY, E.A. Displasia coxofemoral: diagnóstico clínico e radiográfico revisão. **Clínica veterinária**, n.47, p.54-66, 2003.

SOUZA A.N.A. et al. Vertical forces assessment according to radiographic hip grade in German shepherd dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n.1, p. 108–111, 2015.

TODHUNTER, R.J; ACLAND, G.M.; OLIVIER, M. An outcrossed canine pedigree for linkage analysis of hip dysplasia. **J. Hered**, v.90, p.83-92, 1999.

TOMLINSON, J.; McLAUGHLIN, R. Medically managing canine hip dysplasia. **Veterinary Medicine**, v. 91, n. 1, p.48- 53, 1996.

TUDURY, E. A.; SEVERO, M. S.; MACIEL, M. J. Frequência de extrusões de núcleos pulposos cervicais e toracolombares, em cadáveres caninos submetidos à técnica de fenestração. **Cienc. Rural**, v.34, n.4, 2004.

WALLACE, L.J. Canine hip dysplasia: past and present. **Semin. Vet. Med. Surg. (Small Animal)**, v.2, p. 513-528, 1987.

WATT, F.M, HOGAN, B.L. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427-30, 2000.

WOOD, J.L.; LAKHANI, K.H. Hip dysplasia in labrador retrievers, the effects of age at scoring. **Vet Rec.**, v.152, p. 37- 40, 2003.

OEDAYRAJSINGH-VARMA, M.J.; VAN HAM, S.M.; KNIPPENBERG, M.; HELDER, M.N.; KLEIN-NULEND, J.; SCHOUTEN, T.E, et al Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissueharvesting procedure. **Cytotherapy**. v. 8, p. 166-77, 2006.

PU, L.L.Q.; XIANGDONG, C.; FINK, B.F.; DAYONG, G. VASCONEZ HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. **Plast Reconstr Surg.**, v. 117 p. 1845-50, 2006.

RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. V. Preparation of "ghosts" and their properties; adenyl cyclase and other enzymes. **J Biol Chem.** V. 242, p. 5744-50, 1967.

DE UGARTE, D.A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO, Z.; ZUK P.A.; ZHU, M. et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs.**, v.174, p. 101-9, 2003.

GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D.M.; LEDDY, H.A.; ROBEY, P.G.; STORMS, R.W.; GIMBLE, J.M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. **J Cell Physiol**, v. 189: p. 54-63, 2001.

PIERMATTEI DL, FLO G, DECAMP C. The hip joint. In: Brinker, Piermattei and Flo's handbook of small animal orthopedics and fracture repair. 4^a ed. Philadelphia: Saunders. p.461-511, 2006.

PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71-4, 1997.

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

NAKAGE, A. P. M. *et al.* Quantificação de células CD34+ do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural.** v. 39, No. 2, p. 434-41. 2009.

NOTH, U.; STEINERT, A.F.; TUAN, R.S. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 4, n. 7, p. 371-380, 2008.

BYDŁOWSKI, S. P. *et al.* Características Biológicas das células-tronco mesenquimais.

Revista brasileira de hematologia e hemoterapia. v. 31, p. 25-35, 2009.

LUST, G.; TODHUNTER, R. J. Displasia do Quadril: Patogenia. In: SLATTER, Douglas. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais.** 3 ed. São Paulo: Manole, p. 2009-2019, 2007.

WHITWORTH, D. J.; BANKS, T. A. Stem cell therapies for treating osteoarthritis: prescient or premature? **The Veterinary Journal.** v. 202, n. 3, p. 416-424, 2014.

CUCCHIARINI, M.; GIROLAMO, L.; FILARDO, G.; OLIVEIRA, J. M.; et al. Basic science of osteoarthritis. **Journal of Experimental Orthopaedics,** v.3, n. 22, 2016.

VINATIERA, C.; GUICHEUXA, J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. **Physical and Rehabilitation Medicine,** v. 59, n. 3, p. 139–144, 2016.

Anexo I



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Terapia celular em modelo experimental de degeneração articular a partir de cães diagnosticados com displasia coxofemoral*", registrada com o nº de Protocolo 050/2016 (CEUA) e 23084.018602/2016-10 (UFRA), sob a responsabilidade da Professora Dra. Érika Renata Branco – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo *Chordata*, Subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal Rural da Amazônia, em reunião de 25/01/2017, após análise dos documentos apresentados.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/02/17 a 01/01/18
Espécie/linhagem/raça	<i>Canis familiaris</i> (caninos, SRD/CRD - variado)
Número de animais	20 (vinte)
Peso/Idade	15 a 30 kg / 1 a 10 anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Hospital Veterinário prof. Mário Dias Teixeira – HOVET/UFRA

Belém, 03 de fevereiro de 2017.

Profª Dra. Maria Cristina Manno
Coordenadora CEUA UFRA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
Av. Tancredo Neves, nº 2501, Bairro Montese, Belém – PA. CEP: 66.077-901
Contatos: (1)3210-5165 ceua@ufra.edu.br www.comissao.ufra.edu.br/ceua



Anexo II


UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

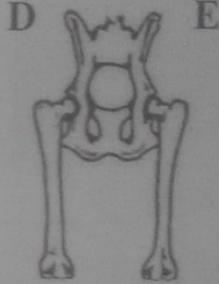
FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

NOME: _____ PESO: _____ PORTE: _____ IDADE: _____
 RAÇA _____ SEXO: M F

NOME _____

DATA DE AVALIAÇÃO: ____/____/____ N.º DO PACIENTE: ____ GRAU _____

AVALIAÇÃO VISUAL:

SINAL CLÍNICO	AUSENTE	PRESENTE	
CLAUDICAÇÃO:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
UNILATERAL:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BILATERAL:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
SIMETRIA MUSCULAR:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ATROFIA MUSCULAR:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
AUMENTO DE VOLUME:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ANDAR:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

AVALIAÇÃO CLÍNICA:

SINAL CLÍNICO	AUSENTE	PRESENTE
DOR A PALPAÇÃO:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SIMETRIA DOS MEMBROS À EXTENSÃO:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CREPITAÇÃO OSSEA À MANIPULAÇÃO:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
AMPLITUDE DO MOVIMENTO ARTICULAR:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DOR A EXTENSÃO:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DOR A ROTAÇÃO EXTERNA:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DOR A ABDUÇÃO DA ARTICULAÇÃO:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SINAL DE ORTALONI:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

DIAGNÓSTICO POR IMAGEM-EXAME- RADIOGRÁFICO

SINAL CLÍNICO	AUSENTE	PRESENTE	D	E
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

