DANIEL TONIN BENEDETTI

**Avaliação do potencial das células de saco vitelino canino comparadas com as
de polpa dentária canina para uso terapêutico em cães com displasia
coxofemoral**

São Paulo
2015

DANIEL TONIN BENEDETTI

Avaliação do potencial das células de saco vitelino canino comparadas com as de polpa dentária canina para uso terapêutico em cães com displasia coxofemoral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Paula Fratini

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3189
FMVZ

Benedetti, Daniel Tonin

Avaliação do potencial das células de saco vitelino canino comparadas com as de polpa dentária canina para uso terapêutico em cães com displasia coxofemoral / Daniel Tonin Benedetti. -- 2015.

75 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula Fratini.

1. Célula de saco vitelino. 2. Células de polpa dentária. 3. Cães. 4. Displasia coxofemoral. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do potencial das células de saco vitelino canino comparadas com células de polpa dentária canina para uso terapêutico em cães com displasia coxofemoral", protocolado sob o nº 2401/2011, utilizando 13 (treze) cães, sob a responsabilidade da Dra. Paula Fratini (Pós-Doutoranda do Departamento de Cirurgia), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Assessing the potential use of yolk sac cells compared with canine dental pulps cells for therapeutic use in dogs with dysplasia", protocol number 2401/2011, utilizing 13 (thirteen) dogs, under the responsibility Dra. Paula Fratini (Pós-Doutoranda do Departamento de Cirurgia), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethical Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BENEDETTI, Daniel Tonin

Título: **Avaliação do potencial das células de saco vitelino canino comparadas com as de polpa dentária canina para uso terapêutico em cães com displasia coxofemoral**

Dissertação Programa de Pós-Graduação
em Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar saúde e sabedoria para poder trilhar meu caminho;

Aos meus pais que sempre foram exemplos de vida na minha formação e pelo apoio constante em minhas escolhas;

À minha esposa Millena C. O. Barchetta pela compreensão dos momentos ausentes, pelo incentivo e carinho constante, sempre acreditando em mim, sonhando comigo e caminhando junto durante esses anos, aos meus filhos Cauê e Maria Flor pelo amor e carinho incondicional;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Paula Fratini por aceitar este desafio, me incentivar e ensinar muito durante estes anos de trabalho;

À Prof.^a Dr.^a Maria Angélica Miglino por apoiar esta pesquisa, ajudar no seu desenvolvimento e a todo o Departamento de Anatomia da FMVZ-USP por sua contribuição;

Ao meu amigo de longa data Rodrigo Stocco que me acolheu muitas vezes em sua casa em São Paulo durante este estudo.

À equipe do Centro de Medicina Veterinária Diagnóstica (CMVD) por todo o apoio, em especial a Dr.^a Andréa Rangel, que teve participação ativa na confecção e avaliação dos exames laboratoriais de toda a pesquisa, meu muito obrigado, sem sua participação essa pesquisa não teria o mesmo valor que tem hoje.

À equipe do Rusvet, em especial a Dr.^a Daniela Amstalden, que também teve participação efetiva na confecção e avaliação dos exames de imagens deste trabalho. Aqui fica registrado o meu muito obrigado, obrigado pelo carinho, pela amizade de tantos anos, pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis, por toda sua ajuda.

As alunas Rosana Sombini e Talita Hayashi pela ajuda e participação na primeira fase da pesquisa.

Aos meus alunos do Laboratório de Cirurgia e Ortopedia (LACO) da Faculdade Max Planck que estiveram presentes e atuantes na segunda fase da pesquisa: Lívia Stolf, Ana Paula Ventura, Tatiane Eri, Gabriela Uchoa, Simone Lucio, Ivan Castro, Alex Zuin, Kátia Nascimento e Débora Ducatti;

À Dr.^a Danielli Santos por acreditar neste trabalho e até participar da mesma com seu animal Maya, muito muito obrigado pela amizade de tantos anos.

A Dr.^a Priscila Ims por ter participado da primeira fase deste projeto com auxílio nas anestésias e também pela amizade, confiança e carinho de longa data.

A coordenadora do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade Max Planck Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda Marvulo e ao coordenador do Hospital Escola desta mesma instituição Prof. Dr. Thyago Dercolli pelo incentivo nesta pesquisa e também na minha atuação como docente;

Ao meu amigo Adriano Barile por me incentivar a começar este estudo, me apresentando inclusive a Dr.^a Paula Fratini, obrigado por poder fazer parte também da sua pesquisa com a qual pude aprender muito;

Aos proprietários dos animais incluídos neste trabalho que se deslocaram muitas vezes de suas cidades para poder participar, cumprindo rigorosamente os prazos determinados.

**Dedico este projeto a toda a minha família,
Que sempre me apoiou e esteve ao meu lado,
Nos bons e maus momentos**

.

RESUMO

BENEDETTI, D. T. **Avaliação do potencial das células de saco vitelino canino comparadas com as de polpa dentária canina para uso terapêutico em cães com displasia coxofemoral.** [Potential evaluation of canine yolk sac cells and dental pulp cells for therapeutic use in dogs with dysplasia]. 2015. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Atualmente a terapia com células-tronco têm sido uma ferramenta útil na medicina regenerativa com alto potencial terapêutico devido à capacidade de auto renovação e diferenciação destas células. Nos últimos anos a ortopedia vem procurando novos métodos para um tratamento que obtenha como efeito a reparação de defeitos articulares de forma mais efetiva e sem procedimentos invasivos. Por isso, muitos estudos envolvendo terapia celular com objetivo de melhorar a reparação articular estão sendo realizados. O objetivo deste estudo foi avaliar a terapia com células-tronco de saco vitelino e de polpa dentária canina em cães com displasia coxofemoral mediante três aplicações celulares (dia 0, 30 e 60, e um controle dia 90). Para a avaliação dos animais tratados foi instituído um grupo controle para cada tipo celular testado, sendo avaliado o escore de claudicação, escore de atrofia muscular, questionário de qualidade de vida, avaliação radiográfica, análise do líquido sinovial e hemograma. Os resultados obtidos demonstraram não haver uma diferença estatística significativa quando comparado os animais dos grupos tratamentos e controle. Quando comparado os animais dos grupos tratamento houve uma diferença estatística significativa para os animais tratados com células-tronco de saco vitelino em relação aos animais tratados com células-tronco de polpa dentária. O tratamento com células de saco vitelino mostrou melhores resultados nos testes de Ortolani.

Palavras-chave: Célula de saco vitelino. Células de polpa dentária. Cães. Displasia coxofemoral.

ABSTRACT

BENEDETTI, D. T. **Potential evaluation of canine yolk sac cells and dental pulp cells for therapeutic use in dogs with dysplasia.** [Avaliação do potencial das células de saco vitelino canino comparadas com as de polpa dentária canina para uso terapêutico em cães com displasia coxofemoral]. 2015. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Currently, stem cell therapy have been a useful tool in regenerative medicine with high therapeutic potential due to the capacity for self renewal and differentiation of these cells. In recent years, orthopedics has been seeking new methods of treatment to obtain the effect of repair of articular defects more effectively and without invasive procedures. Therefore, many studies involving cell therapy in order to improve the repair articular are being conducted. The aim of this study was to evaluate the therapy with stem cells from the yolk sac and canine dental pulp in dogs with hip dysplasia by three mobile applications (day 0, 30 and 60, and one day control 90). For the evaluation of the treated animals was set up a control group for each cell type tested, and rated the lameness score, muscular atrophy score, a questionnaire about quality of life, radiographic evaluation, synovial fluidanalysis and blood count. The results showed that there was no statistically significant difference when compared animal treatment and control groups. Comparing the animals, treatment groups showed a statistically significant difference for the animals treated with stem cells from the yolk sac for the animals treated with stem cells from dental pulp. Treatment with yolk sac cells showed better results in Ortolani tests.

Keywords: Yolk sac cell. Dental pulp. Dog. Hip dysplasia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cultura de células de saco vitelino	33
Figura 2 - Cultura de células de polpa dentária	34
Figura 3 - Coleta de líquido sinovial e aplicação celular intra-articular coxofemoral	45
Figura 4 - Exame radiográfico do animal B4 durante o tratamento	51
Figura 5 - Exame radiográfico do animal A2 durante o tratamento	51
Figura 6 - Exame radiográfico do animal D4 durante o tratamento	52
Figura 7 - Exame radiográfico do animal C3 durante o tratamento	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Animais selecionados para o estudo	35
Quadro 2 -	Grupo 1 (A) referente ao grupo controle do tratamento com célula de saco vitelino	36
Quadro 3 -	Grupo 1 (B) referente ao grupo tratamento com células de saco vitelino	37
Quadro 4 -	Grupo 2 (C) referente ao grupo controle do tratamento com células de polpa dentária	37
Quadro 5 -	Grupo 2 (B) referente ao grupo tratamento com células de polpa dentária	38
Quadro 6 -	Escores de avaliação de atrofia muscular	39
Quadro 7 -	Escores de avaliação de claudicação	40
Quadro 8 -	Escores de avaliação de dor à rotação e abdução da articulação coxofemoral (Teste de Ortolani)	40
Quadro 9 -	Questionário para avaliação de qualidade de vida dos animais	41
Quadro 10 -	Tabela de referência do hemograma dos animais testados neste estudo	43
Quadro 11 -	Tabela de referência para os valores de análise do líquido sinovial de cães	43
Quadro 12 -	Avaliação individual dos animais tratados com células-tronco no dia 90 de tratamento	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Etiologia.....	16
2.2	Diagnóstico	18
2.3	Sinais clínicos	20
2.4	Prevenção	20
2.5	Tratamento	21
2.5.1	Tratamento conservador	21
2.5.2	Tratamento cirúrgico	23
2.6	Terapia celular	23
2.6.1	Célula-tronco de saco vitelino canino	26
2.6.2	Células-tronco de polpa dentária canina	28
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVO	31
4.1	Objetivo geral	31
4.2	Objetivos específicos	31
5	MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1	Cultivo de células do saco vitelino de fetos caninos	32
5.2	Cultivo de células de polpa dentária canina	33
5.2.1	Preparação das células para aplicação terapêutica	34
5.3	Seleção dos casos clínicos – critérios de inclusão do animal no estudo	34
5.4	Divisão dos grupos e metodologia de aplicação celular	36
5.5	Exames físicos	39
5.5.2	Escore de claudicação	39
5.6	Exames complementares	42
5.6.1	Técnica radiográfica simples	42

5.6.2	Exames laboratoriais	42
5.7	Análise estatística	44
5.8	Procedimento anestésico e controle da dor	44
5.9	Aplicação de célula-tronco de saco vitelino e de polpa dentária canina em cães com displasia coxofemoral	44
6	Medicação pós-operatória.....	46
7	RESULTADOS	47
7.1	Teste de Ortolani	47
7.2	Qualidade de vida	47
7.3	Hemograma	48
7.4	Análise do líquido sinovial	49
7.5	Escore de atrofia muscular	49
7.6	Escore de claudicação	50
7.7	Avaliação radiográfica	50
9	Conclusão	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

A displasia coxofemoral (DCF) é uma alteração do desenvolvimento que afeta a cabeça, colo femoral e o acetábulo. É de transmissão hereditária, recessiva, intermitente e poligênica. Fatores biomecânicos, do ambiente e nutricional, associado à hereditariedade pioram a condição desta patologia (SOMMER; FRATOCCHI, 1998).

A palavra displasia tem origem grega, derivando de “dys” que significa anormal e “plassein” forma (MORGAN; STEPHENS, 1985; ALLAN, 2002; WOOD; LAKHANI, 2003). Foi relatada pela primeira vez em 1935 e descrita como Subluxação Congênita da Anca, em 1937 (SWENSON et al., 1997; MÄKI; LIINAMO, 2000).

Desde os primeiros relatos de DCF, há mais trabalhos escritos a respeito desta moléstia do que sobre qualquer outra enfermidade relacionada à ortopedia de pequenos animais (FERRIGNO et al., 2007).

O histórico e os sinais clínicos dos animais afetados incluem anormalidades no andar, como claudicação, passos curtos, salto igual a coelho, assim como intolerância ao exercício e dificuldade em levantar-se e subir degraus (TOMLINSON; McLAUGHLIN, 1996; HULSE; JOHSON, 2002; RAWSON et al., 2005). Entre as modalidades de tratamento são descritas os cirúrgicos e conservativos. Este segundo restringe-se ao controle de peso, restrição de exercícios, reabilitação física, tratamento da dor e administração de suplementos nutracêuticos (TOMLINSON; McLAUGHLIN, 1996). Os procedimentos cirúrgicos descritos em animais são: sinfisiodesse púbica juvenil (DUELAND et al., 2001), colocefalectomia (RAWSON; ARONSOHN; BURK, 2005), osteotomia tripla da pelve (SCHULZ; DEJARDIN, 2003), substituição total de quadril (OLMSTEAD et al., 1983) e denervação capsular (GASSE et al., 1983; KINZEL et al., 2002a,b; BRAUN et al., 2003; FERRIGNO et al., 2007; FERRIGNO; SCHMAEDECKE; FERRAZ, 2007).

Na medicina veterinária a displasia coxofemoral (DCF) tem-se apresentado como uma das principais patologias osteo-articulares com acometimento canino, sendo responsável por cerca de 50% dos atendimentos de especialistas (SCHMAEDECKE, 2004).

Atualmente a terapia celular têm sido uma ferramenta útil na medicina regenerativa com alto potencial terapêutico devido à capacidade de auto renovação e diferenciação destas células (WANG et al., 2009). Nos últimos anos a ortopedia vem procurando novos métodos para um tratamento que obtenha como efeito a reparação de defeitos articulares de forma mais efetiva e sem procedimentos invasivos. Por isso, muitos estudos envolvendo terapia celular com objetivo de melhorar a reparação articular estão sendo realizados (BARROS et al., 2001; BLACK et al., 2007; QUEIROZ et al., 2010). As células-tronco mesenquimais podem ser extraídas de diversos órgãos e tecidos, expandidas em cultura como uma população aderente de células e induzidas a se diferenciar em múltiplos tipos celulares (BAKSH et al., 2004; DOCHEVA et al., 2007). As células-tronco mesenquimais são capazes de se diferenciar em várias linhagens celulares, como condrócitos, osteócitos, adipócitos, monócitos e astrócitos, contribuindo para o avanço da terapia celular nas moléstias ortopédicas (DJOUAD et al., 2013). Baseada na observação de que as células-tronco mesenquimais podem se diferenciar em outros tipos celulares, os pesquisadores começaram a testar estas células mesenquimais para reparo tecidual *in vivo* (KRAMPERA et al., 2006). Em várias doenças do sistema cardiovascular, pulmonar, traumas medulares, no sistema nervoso central e em defeitos ósseos cartilaginosos (BEYER et al., 2006; LE BLANK et al., 2006; FOROSTYAK; JENDELOVA; SYKOVA, 2013; LEE et al., 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

Segundo Henricson et al. (1966) DCF é a mais comum patologia articular na espécie canina que ocorre igualmente em machos e fêmeas. Ela tem sido associada à frouxidão articular (TORRES, 2005). Segundo a definição de Alexander (1992), a DCF de cães foi definida como uma doença biomecânica, representada pela disparidade entre a massa muscular primária e o rápido crescimento ósseo (FERRIGNO; SCHAMAEDECKE; FERRAZ, 2007).

O termo DCF refere-se ao desenvolvimento anormal da articulação coxofemoral. A DCF pode acometer várias raças de cães, entretanto é mais comum nas de médio e grande porte (COOK; TOMLINSON; CONSTANTINESCU, 1996; ETTINGER; FELDMAN, 2004; BARROS et al., 2008).

A base fisiopatológica dessa afecção é uma disparidade entre a massa muscular da articulação coxofemoral e um desenvolvimento ósseo rápido. Como resultado disso, desenvolve-se instabilidade ou frouxidão na articulação coxofemoral, que predispõem a articulação a alterações degenerativas, como osteofitose, esclerose óssea acetabular, espessamento do colo femoral, fibrose da cápsula articular e subluxação da cabeça femoral (SOUZA; TUDURY, 2003).

Arnbjerg (1999) vai além em sua definição, relatando que a DCF é uma síndrome relativa ao desenvolvimento músculo-esquelético anormal, causada primariamente por predisposição genética, mas com ação de outros fatores como rápido crescimento, exercícios intensos, constituição alimentar e ambiente em que vive o animal (FERRIGNO; SCHAMAEDECKE; FERRAZ, 2007).

A ingestão de dietas de alta densidade, ricas em proteínas, energia, cálcio, fósforo, por cães em crescimento pode desencadear problemas ósseos e esqueléticos. O consumo excessivo destes alimentos contribui para o aceleração do crescimento, induzindo à alterações anatômicas como: DCF, coxa valga, osteodistrofia hipertrófica, exostose, osteocondrose dissecante. A hipercalcêmica resulta em níveis elevados de calcitonina plasmática alterando de forma significativa a remodelação óssea e a maturação da cartilagem (HEDHAMMAR et al., 1979).

Steinetz et al. (1987) observou que após medições das concentrações plasmáticas de relaxina em cadelas prenhes e em filhotes no período de aleitamento, conclui-se que ela passa na sua forma ativa na amamentação, através do leite. Devido a esses altos níveis encontrados foi verificado que este hormônio era responsável pela instabilidade articular nos filhotes, por exercer importante alteração nos tecidos conectivos da pelve. Essa instabilidade articular levaria a DCF.

Vários fatores estão relacionados ao desenvolvimento da doença, porém a frouxidão articular é considerada fator primário para o estabelecimento da DCF (COOK; TOMLINSON; CONSTANTINESCU, 1996; ETTINGER; FELDMAN, 2004; KEALY; MACALLISTER, 2005; BARROS, 2008). Morgan (1985) 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. Em seu estudo retrospectivo de 11 anos, encontrou 30,9% de assimetria em cães displásicos da raça Pastor Alemão, sendo 16,4% unilateral e 14,5% bilateral (BARROS, 2008). Segundo Barros (2008) a idade média dos cães foi de $33,8 \pm 23,5$ meses. Os animais eram assintomáticos e foram encaminhados exclusivamente para avaliação das articulações coxofemorais.

Apesar de se ter passado tantos anos de seu primeiro relato não se afirma seguramente qual a exata etiologia da afecção. Existem indícios comprovados somente pela hereditariedade da doença de que exista uma ação poligênica responsável por lesões primárias na cartilagem e nos músculos que fazem suporte da região coxofemoral (ALEXANDER, 1992) associada à participação ambiental. Uma das hipóteses mais aceitas atualmente é a de que cães acometidos nascem com articulação normal e, devido a fatores genéticos, forças musculares não são suficientes para manter a cabeça do fêmur no acetábulo, causando lassidão da articulação coxofemoral e, conseqüentemente, incongruência articular com posterior doença articular degenerativa (ALEXANDER, 1992). A dor, com conseqüente claudicação e impotência funcional dos membros pélvicos é causada inicialmente pela lassidão e instabilidade articulares, sendo observada frequentemente em animais jovens. Na fase crônica da doença, estes sinais clínicos são decorrentes do processo de degeneração secundária à incongruência articular. Tal degeneração resulta em lesões na cartilagem, micro fraturas da cabeça femoral e acetábulo e processos inflamatórios da cápsula articular (FERRIGNO et al., 2007). Percebe-se

especial dificuldade nos animais acometidos em levantar-se e deitarem-se, momentos em que normalmente está presente a vocalização por sensibilidade dolorosa. Ainda é relatada como sinal clínico presente a atrofia muscular de membros pélvicos, de acordo com a severidade do caso. Esse fato parece estar relacionado à transferência de peso para os membros torácicos, na tentativa de minimizar a dor e desconforto articular (FERRIGNO; SCHAMAEDECKE; FERRAZ, 2007).

A DCF é hereditária (BLISS et al., 2002), mas a sua expressão genética é condicionada por diversos fatores ambientais: atividade física (EVERTS et al., 2000; REED et al., 2000); nutrição (EVERTS et al., 2000); metabolismo (BELFIELD, 1976); e possivelmente influências hormonais (GOLDSMITH et al., 1994). A genética da doença é complexa, a expressão fenotípica é determinada pela interação de vários genes e afetada por inúmeros fatores ambientais (EVERTS et al., 2000; REED et al., 2000).

2.2 Diagnóstico

O diagnóstico nem sempre é fácil, e não existe nenhum método que por si só permita despistar todos os casos (KAPATKIN et al., 2002).

Os exames radiográficos caracterizam a DCF pelo arrasamento do acetábulo, achatamento da cabeça do fêmur, sub-luxação ou luxação coxofemoral e alterações secundárias da articulação (LUST, 1997¹ apud BARROS, 2008, p. 1557).

O método de diagnóstico mais aceito é o exame radiográfico. No método radiográfico convencional (MRC) os critérios de classificação e a idade para realização do exame variam consideravelmente. Recomenda-se que o exame seja feito com, no mínimo, 12 meses de idade em raças de médio e grande porte. O diagnóstico depende da observação de evidências da frouxidão articular e alterações osteoartróticas. Se for grave, a doença poderá ser identificada desde os seis meses até um ano de idade, caso contrário só aos dois anos de idade ou mais.

¹LUST, G. An overview of the pathogenesis of canine hip dysplasia. **Journal of American Veterinary Association**, v. 210, p. 1443-1445, 1997.

Cerca de 80% dos cães susceptíveis revelam-se displásicos ao exame radiográfico com um ano de idade (LUST; RENDANO; SUMMERS, 1985; WALLACE, 1987; TORRES, 2005).

O ângulo de Norberg (AN) adotado no MRC permite quantificar a relação entre a cabeça do fêmur e o acetábulo. Se for igual ou superior a 105° a articulação é considerada normal (VIERIA et al., 2010). Sua medida em idade precoce pode ser útil para determinar o grau de subluxação coxofemoral em idade adulta (VIERIA et al., 2010). No entanto, observou-se que 55% dos cães classificados pelo MRC como normais apresentam sinais de DCF ao fim da vida. Assim, o grande número de diagnósticos falsos negativos pode explicar o lento progresso na redução da frequência e gravidade da DCF (KAPATKIN et al., 2002).

Pelo método radiográfico por distração (MRD), realizado em filhotes de quatro meses de idade, observou-se 4% e 12% de falsos negativos, quando foram reexaminados aos 12 meses de idade (TORRES, 2005). Além do diagnóstico radiográfico, a anamnese e o exame físico são essenciais para observar se há claudicação, se a mesma piora após o exercício, dificuldade do animal em se levantar, relutância em correr ou saltar, dor, crepitação à manipulação da articulação, atrofia muscular dos membros pélvicos e hipertrofia dos membros torácicos (TUDURY; SEVERO; MACIEL, 2004). O sinal de Ortolani positivo pode estar ausente em casos crônicos devido à fibrose na articulação, porém positivo nos casos mais recentes. Esse teste visa produzir através da abdução do fêmur, com o animal anestesiado, um “click”, som este produzido quando a cabeça do fêmur subluxada entra no acetábulo (NOGUEIRA; ROCHA; TUDURY, 2005).

Em cães jovens a DCF devem ser diferenciada de panosteíte, osteodistrofia hipertrófica, osteocondrose e lesão incompleta do ligamento cruzado cranial (HULSE; JOHNSON, 2002).

A base de um diagnóstico correto da DCF deve se basear na idade, raça, história, achados físicos e sinais radiográficos (HULSE; JOHNSON, 2002).

2.3 Sinais clínicos

Os sinais clínicos podem ser discretos em animais jovens e bem característicos em animais com idade mais avançada. Esses dois grupos se dividem em animais entre quatro e doze meses de idade e o de animais acima de quinze meses de idade (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 1999).

Os animais do primeiro grupo geralmente apresentam os sinais clínicos de uma forma mais aguda, diminuem a atividade física diária, apresentam dor e claudicação dos membros pélvicos. É observado nesses animais atrofia muscular dos membros pélvicos e atribuído os sintomas clínicos a sinovite, estiramento do ligamento Redondo da cabeça do fêmur, efusão articular, erosão na cartilagem articular e micro fraturas no acetábulo (TOMLINSON; MCLAUGHLIN, 1996).

Os animais do segundo grupo, geralmente são cães maiores que apresentam os sinais clínicos decorrente das alterações degenerativas ocorrida na articulação. Como sinais clínicos podem apresentar: claudicação bilateral após o exercício físico, restrição de movimentos, atrofia muscular dos membros pélvicos e crepitação articular. Os sinais comuns em ambos os grupos são a dificuldade em levantar-se e relutância em subir ou descer escadas (COOK; TOMLINSON; CONSTANTINESCU, 1996). Sinal de Ortolani positivo é comum (NOGUEIRA; ROCHA; TUDURY, 2005), assim como um andar semelhante a um coelho (MARTINEZ, 1997).

Em animais mais velhos os sinais clínicos são diferentes, pois sempre está associado a dor devido à afecção articular degenerativa (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 1999).

2.4 Prevenção

As recomendações terapêuticas para os animais susceptíveis de vir a desenvolver a doença, nem sempre são fáceis e consensuais (REMEDIOS, 1995). Neste caso, mais importante que a confiabilidade e precisão de diagnóstico são a capacidade de previsão da doença e da sua magnitude, antes de qualquer sinal radiográfico convencional ou clínico se manifestar (KAPATKIN et al., 2002). A

progressão da DCF é imprevisível e as publicações científicas existentes que documentam a eficácia das opções terapêuticas em longo prazo são escassas (REMEDIOS, 1995). Os objetivos principais na prevenção da DCF devem ser: prevenir os danos na cartilagem, que estão na base do desenvolvimento da DCF (KAPATKIN et al., 2002); evitar a dor, e manter a qualidade de vida e a função (MORGAN; STEPHENS, 1985).

2.5 Tratamento

Para o tratamento da displasia coxofemoral podem ser adotados métodos conservativos, clínicos e cirúrgicos (REGONATO, 2009).

Nos últimos anos, tratamentos alternativos menos cruentos vêm sendo pesquisados. Em estudo Kinzel et al. (2002a) e Ferrigno et al. (2007) relataram a técnica de deservação da cápsula articular coxofemoral, que, segundo os autores, trata-se de neurectomia seletiva de fibras sensitivas da cápsula articular, com intuíto puramente analgésico.

2.5.1 Tratamento conservador

Apesar da existência de várias alternativas de tratamento, não há ainda uma conduta considerada ideal. Nenhum tratamento atualmente existente é efetivo em restaurar a articulação displásica em uma articulação completamente normal. O que se pretende com o tratamento é aliviar a dor, retardar as alterações degenerativas secundárias e permitir a máxima função articular (BERGAMO, 2006).

Um tratamento conservador a longo prazo deve associar o controle de peso, exercício e administração de anti-inflamatórios. O exercício deve ser controlado, devendo ser de grande intensidade com pouco tempo de duração e aquecimento prévio (HULSE; JOHNSON, 2002). A redução do peso pode trazer benefícios

significantes para cães com sobrepeso e portadores da DCF (IMPELLIZERI; TETRICK; MUIR, 2000). Exercícios de baixo impacto demonstram benefícios no tratamento de pacientes portadores de osteoartrose (HUDSON; HULSE, 2004). Para manter a manutenção da força muscular e também a função articular normal pode-se realizar exercícios regulares de baixo impacto, como hidroterapia, natação e caminhadas na guia. Um programa de exercícios deve ser pensando e ajustado individualmente para cada paciente, suas limitações e sinais clínicos observados (DAVIDSON et al., 2008).

Em pacientes com grande perda muscular e fraqueza pode-se utilizar outros planos de exercícios que podem incluir a eletroestimulação muscular na recuperação da força. Exercícios passivos e ativos podem auxiliar na recuperação da amplitude de movimentos, no metabolismo e na difusão dos nutrientes na cartilagem (CROOK, 2004).

A acupuntura pode ser utilizada, de preferência associada a outras terapias para que se obtenha um efeito sinérgico positivo (MCCANLEY; GLINSKY, 2004).

O efeito condroprotetor dos glicosaminoglicanos é resultado da inibição da síntese de enzimas destrutivas e prostaglandinas presentes na doença articular degenerativa. A condroestimulação ocorre devido à melhora na produção de proteoglicanos feita pelos condrócitos, bem como pela elevação da concentração de ácido hialurônico no fluido sinovial e pela melhora da estrutura dos proteoglicanos da cartilagem articular. O sulfato de condroitina é um dos glicosaminoglicanos mais utilizados em pequenos animais principalmente por sua facilidade de administração e aquisição (BERGAMO, 2006).

A administração de anti-inflamatórios não esteroidais é muito utilizada, principalmente o carprofeno e o firocoxib (OLIVIA et al., 2004). A atuação do firocoxib que pertence a grupo dos coxibes é através da inibição seletiva da COX-2, melhorando o grau de alívio da dor (PLUMB'S, 2008). O carprofeno pertence à classe do ácido arilpropiónico, inibindo reversivelmente a COX-2, tendo a capacidade de modificar a resposta imune mediada por células (JOHNSTON; BUDSBERG, 1997).

Alguns trabalhos sugerem que aplicações de glicosaminoglicanos têm efeito anti-inflamatório benéfico. Os corticosteroides devem sempre ser utilizados com

cautela, pois causam imunossupressão, acentuam os danos às cartilagens e causam supressão da adrenal (HULSE; JOHNSON, 2002).

Quando a terapia conservativa para displasia coxofemoral mostra-se ineficaz, é indicado o tratamento cirúrgico.

2.5.2 Tratamento cirúrgico

Diversos procedimentos cirúrgicos podem ser realizados com o objetivo de impedir a progressão da doença articular degenerativa. No entanto, a depender do estágio em que se encontra a articulação do paciente, a técnica cirúrgica empregada pode variar (REGONATO, 2009).

Os tratamentos cirúrgicos como, pectinectomia, osteotomias corretivas, artroplastia das bordas acetabulares, osteotomia pélvica tripla e outras técnicas similares ainda mostram resultados controversos (MATIS, 2000; BOLLINGER et al., 2002; KINZEL et al., 2002; QUEIROZ, 2011). Os tratamentos recomendados para cães com DCF devem levar em conta a idade do animal, grau de desconforto, achados radiográficos e no exame físico, bem como os recursos financeiros do proprietário do paciente (HULSE; JOHNSON, 2002).

A literatura é clara em afirmar que o tratamento cirúrgico que apresenta os melhores resultados é a alo-artroplastia, ou a substituição das partes articulares por uma prótese metálica, a despeito dos seus custos e complicações pós-cirúrgicas inerentes à técnica operatória (OLMSTEAD 1995; MATIS, 2000; SUMMER- SMITH 2000; KINZEL et al., 2002).

2.6 Terapia celular

Vem crescendo o número de trabalhos em que se verifica com sucesso a recuperação de tecidos ou órgãos lesados utilizando as células-tronco adultas

(TEIXEIRA, 2005; DEL CARLO; MONTEIRO; ARGOLO-NETO, 2009; PINTO FILHO et al., 2013). A pesquisa com células-tronco está revelando o conhecimento sobre como um organismo se desenvolve a partir de uma única célula e como as células saudáveis substituem as danificadas em organismos adultos. Esta promissora área da ciência também está conduzindo a possibilidade de terapias celulares para tratar doenças, o que é denominado como medicina regenerativa ou de reparo (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003; DEL CARLO, 2005; BLACK et al., 2007; INNES et al., 2013).

De acordo com o período de isolamento durante a ontogênese as células-tronco podem ser classificadas em: embrionária, fetal e adulta. O termo célula-tronco se refere a células com a capacidade em gerar células filhas com características similares da célula mãe, bem como em si diferenciar em células especializadas. Podemos citar como exemplo as células tronco hematopoiéticas que originam todas as células tronco hematopoiéticas (WENCESLAU, 2009), as células tronco neurais que originam neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (GAGE, 2000) e as células mesenquimais que dão origem a fibroblastos, osteoblastos e adipócitos (HAYNESWORTH et al., 1992; BOCCHI; FERREIRA, 2005; JAFREDO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2008; DEL CARLO, 2009; PINTO FILHO et al., 2013).

As células-tronco são células primordiais de origem mesodermal, que formam o tecido conjuntivo de todo o organismo, podendo originar, fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, células musculares, hematopoiéticas, células endoteliais, bem como as células estromais (DENNIS; CAPLAN, 2004). Elas são sítios da hematopoiese, como ilhas de células sanguíneas primitivas (AUERBACH et al., 1998).

Baksh et al. (2004) realizou muitos trabalhos na tentativa de isolar as células-tronco mesenquimais em cultivo utilizando soro. Seus resultados aproximaram-se de uma população de células-tronco mesenquimais purificadas. Este avanço trouxe o entendimento e muitos esclarecimentos em relação à biologia destas células, porém gerou diferenças em torno da terminologia adequada aplicável, para as células com capacidade de adesão e morfologia fibroblastóide, derivadas dos mais diversos tecidos. Porém, este termo células-tronco mesenquimais, é frequentemente empregado para os tipos celulares com as características mencionadas acima.

De acordo com os estudos realizados pelos autores Zanjani et al. (1993); Clapp et al. (1995); Guerreiro et al. (1997); Tavian et al. (1999) e Yu (2008), o fígado, medula óssea e sangue fetal, são considerados sítios de origens de células-tronco mesenquimais (MSC) por três razões; primeiro foi comprovado que as células-tronco mesenquimais adultas, encontradas na medula promovem sinais para diferenciação e proliferação de células-tronco hematopoiéticas, através de interações celulares. Em segundo, porque durante a organogênese humana foi demonstrada a proliferação e diferenciação de progenitores hematopoiéticos em diversos microambientes como saco vitelino, região ventral da aorta, fígado fetal, timo, baço e medula óssea, onde as células-tronco atingem estes órgãos através da circulação fetal (WENCESLAU, 2009).

As células-tronco ideais para a utilização em medicina regenerativa devem ser provenientes de fontes de fácil acesso, preferencialmente possuir rápida expansibilidade em cultivo, deve ser imunologicamente inerte, apresentar capacidade de sobrevivência e integração no sítio hospedeiro e ter capacidade de se diferenciar em outros tipos de células especializadas (AZIZI; STOKES; PROCKOP, 1998). As células-tronco de origem fetal são consideradas uma fonte promissora deste tipo celular, podendo ser isoladas tanto do feto quanto de suas estruturas extra fetais, tais como cordão umbilical, medula óssea, líquido amniótico, membrana amniótica, placenta, entre outras (BOSSOLASCO et al., 2006). Estas MSC isoladas de tecidos fetais são menos imunogênicas, não expressando o antígeno tipo II de superfície leucócito humano (HLA) (MIAO et al., 2006). As MSC possuem uma alta capacidade de expansão mitótica *in vitro*, sendo estas responsáveis pela manutenção e renovação de tecidos adultos. Este tipo celular vem sendo bastante explorado nos últimos anos, devido ao seu potencial para a regeneração de órgãos e tecidos e terapias celulares, clinicamente estas células estão sendo exploradas em várias condições, incluindo lesões ortopédicas, doenças auto imunes e doenças hepáticas (KIM, 2007).

As culturas de MSC podem ser aplicadas *in situ* (no local da lesão), isoladas ou combinadas com substitutos ósseos e biomateriais ou mesmo por infusão intravenosa (MONTEIRO et al., 2008), podendo estar diferenciadas ou não.

Estudos contemporâneos vêm sendo realizados, descrevendo a utilização autógena e alógena das MSC para a reparação de diversos tecidos. A grande aplicação em Medicina Veterinária deve-se também a geração de inúmeros modelos experimentais aplicáveis em seres humanos (MONTEIRO, 2009).

2.6.1 Célula-tronco de saco vitelino canino

Os cães apresentam uma placenta zonária, que envolve completamente o feto e uma organização lamelar complexa dos tecidos maternos e fetais. O saco vitelino consiste de uma saculação em formato de “T” invertido e um enorme número de vasos sanguíneos (MIGLINO et al., 2006). O saco vitelino de cães é uma membrana fetal, sendo composta morfológicamente por três camadas: endoderma, mesotélio e mesênquima vascular (LEE et al., 1983; BJORKMAM et al., 1989). Esta estrutura fetal é de extrema importância por ser um medidor de trocas entre o feto e a mãe (RUSSE et al., 1992), persistindo até o nascimento do filhote (LEE et al., 1983; BJORKMAM et al., 1989).

Foi demonstrado que precursores derivados do saco vitelino são responsáveis pela colonização e pelo desenvolvimento hematopoiético de outros tecidos, sendo sequencialmente desenvolvidos no embrião e no feto, como, por exemplo, no fígado, timo, baço, bursa de fabricio nos pássaros e medula óssea (MOORE; METCALF, 1970² apud TAVIAN, 1999, p. 793).

No embrião em desenvolvimento, a hematopoiese inicial e a estrutura vascular foram identificadas nas ilhas de sangue do saco vitelino, sendo formadas por mesoderma e agregados que migraram no início da formação, as células externas diferenciam-se em células endoteliais e as internas em sangue primitivo.

² MOORE, M. A. S.; METCALF, D. Ontogeny of the hematopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **British Journal of Haematology**, v. 18, p. 279-296, 1970.

São também ilhotas sanguíneas do saco vitelino que estão relacionadas com o sistema cardiovascular primitivo (MIGLINO et al., 2006).

Lee et al. (1983), ao estudar a ultra estrutura do saco vitelino do cão verificou que os principais constituintes do mesênquima são vasos sanguíneos, ilhas sanguíneas, fibras, tecido conectivo ou conjuntivo e células do tecido conjuntivo. O autor ressalta que, no interior das ilhas vasculares do saco, há uma grande quantidade de eritrócitos, em vários estágios de desenvolvimento ou maturação. Com base na organização morfológica e seus componentes celulares como relatado pelos autores, era esperado o crescimento de células fibroblast-like em cultivo, pois o anexo embrionário é constituído por nichos de células tronco, que se encontram especificamente no interior das ilhas eritropoiéticas, partindo de um precursor comum o hemangioblasto (AUERBACH et al., 1998).

O saco vitelino produz um estoque de células hematopoiéticas que nutrem o embrião formando o sangue, parte destas células será diferenciada no próprio tecido, enquanto outras irão colonizar órgãos hematopoiéticos. O microambiente do saco vitelino pode influenciar na diferenciação das células hematopoiéticas, podendo dar origem as células mielóides, hematopoiéticas e eritróides (JAFREDO et al., 2005). O fato do sítio intra-embrionário do saco vitelino ser capaz de colonizar células-tronco multipotentes pode estar relacionado com o potencial hematopoiético da membrana (MEDVINSKY et al., 1993).

O término da associação do desenvolvimento entre hematopoiese e células endoteliais, leva-nos a crer na hipótese de que elas partem de um progenitor comum, o hemangioblasto. Existem várias evidências demonstrando que entre as células que compõem o saco vitelino dos mamíferos estão presentes precursores multipotentes, células que podem se diferenciar em eritrócitos maduros, linfócitos, células mielóides e células que compõem a linhagem celular sanguínea primitiva e não só em eritrócitos nucleados embrionários primitivos. O saco vitelino é referido como o primeiro local onde ocorre a formação de vasos sanguíneos nos mamíferos (AUERBACH et al., 1998).

Wenceslau (2009), realizou expansão celular do saco vitelino de cadelas com idades gestacionais de 30, 40 e 60 dias através da técnica de explant, com posterior cultivo. Pode-se concluir com este trabalho, ser possível isolar células-tronco mesenquimais do tecido vitelino nos diferentes períodos gestacionais, visto

que, as células descritas possuem características *fibroblast-like* semelhantes aos encontrados nas células-tronco mesenquimais.

2.6.2 Células-tronco de polpa dentária canina

Nos mamíferos o dente se desenvolve na maxila e mandíbula, variando sua morfologia de acordo com a espécie, porém as estruturas se mantêm similares (esmalte, cemento e dentina, a polpa e o periodonto) (YEN; SHARPE, 2008).

Derivada de componentes ectodérmicos a polpa dentária é dividida em quatro camadas: a mais externa (primeira), composta por odontoblasto produzindo dentina; sua segunda camada é pobre em células e rica em matriz extracelular; a terceira camada contém células progenitoras com plasticidade e pluripotência; já sua camada mais interna contém a área vascular e o plexo nervoso (GRAZIANO et al., 2008).

Em 2000 alguns autores questionaram se a polpa de dente adulta deveria, assim como a medula óssea, possuir uma população de células tronco. Após isolarem células deste tecido e compará-las com as células-tronco de medula óssea apresentaram multipotencialidade, heterogeneidade, capacidade de proliferação e de formar colônias in vitro. Na sequência foi descoberto que os dentes decíduos também são uma rica fonte de células tronco mesenquimais, podendo se proliferar, reparar estruturas dentárias danificadas, induzir regeneração óssea e possivelmente tratar tecidos lesados (MIURA et al., 2003).

Um dente decíduo que seria normalmente descartado, não é um órgão vital e seu fácil acesso torna este tecido um grande atrativo para a utilização em terapia celular. As células-tronco de tecido pulpar possuem alta capacidade de diferenciação, boas interatividade com biomateriais, sendo uma boa opção para reconstrução tecidual (BARROS et al., 2001; GRAZIANO et al., 2008; PINTO FILHO et al., 2013). Em seres humanos esta linhagem celular apresentou um potencial proliferativo elevado, capacidade de auto renovação e diferenciação em várias linhagens, podendo servir como modelo para o estudo da diferenciação de células

tronco adultas *in vitro* e regeneração de tecidos *in vivo* (LIMA et al., 2012; PINTO FILHO, 2013).

As células-tronco de polpa dentária podem ser criopreservadas por períodos longos, sendo possível à criação de criobancos de células o que favoreceria sua utilização clínica (GRAZIANO et al., 2008; PERY et al., 2008; WOODS et al., 2009).

Foi demonstrado em alguns estudos nos últimos anos que além da capacidade de diferenciação em osteócitos, odontoblastos e adipócitos, as células-tronco da polpa dentária podem se diferenciar em outras linhagens como as neurais (HUANG; SNYDER; CHENG, 2008; SOUZA, 2008; ISHKITIEV et al., 2010). Potdar e Jethmalani (2015) citam ainda a diferenciação dessas células em cardiomiócitos, condrócitos, osteoblastos, células hepáticas e células B das ilhotas do pâncreas, demonstrando grande potencialidade ser usada em medicina regenerativa e várias doenças humanas incluindo cirurgia dentária e problemas relacionados.

Células-tronco mesenquimais derivadas da polpa dentária (DPSCs) atualmente estão sendo frequentemente utilizadas, principalmente na odontologia humana por apresentarem facilidade na coleta associada à baixa morbidade. Em comparação com células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea apresentam melhor habilidade em tecidos calcificados (PINTO FILHO et al., 2013).

Células-tronco isoladas da polpa dentária de cães foram investigadas para suas propriedades por meio de análise de suas características clonogênica e de seus crescimentos, pela expressão de marcadores de superfície e pela avaliação do seu potencial osteo-odontogênico, adipogênico e neurogênico. Os resultados demonstraram que essas células foram capazes de diferenciar em linhagem odontoblástica funcional, com potencial de mineralização ativa *in vitro*. Apresentaram também uma taxa superior de proliferação e diferenciação sobre as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana. Os resultados deste trabalho pode confirmar a utilização das células-tronco mesenquimal de polpa dentária canina na engenharia de tecidos dentários e, ainda, estabelece o cão como modelo adequado na pesquisa odontológica (DISSANAYAKA et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

A grande casuística de animais com doença articular, em especial a displasia coxofemoral, principalmente em cães de raça grande e gigante, fornece modelos bastante enriquecedores para estudos de terapia celular visando avanços na área da medicina veterinária regenerativa. Tendo em vista o grande número de tratamentos cirúrgicos convencionais e tratamentos conservadores não eficientes para impedir a avanço da osteoartrose, é de grande importância buscar terapêuticas eficientes para auxiliar este problema e contribuir para o avanço da ortopedia veterinária.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com células tronco mesenquimais do saco vitelino e polpa dentária canina no tratamento clínico-cirúrgico da displasia coxofemoral nesta espécie.

4.2 Objetivos específicos

- Manutenção e expansão das culturas de células-tronco de saco vitelino e polpa dentária canina, podendo assim estabelecer condições ideais de tratamento com as mesmas;
- Avaliar mediante escore de claudicação, escore de avaliação de atrofia muscular, teste de Ortolani e questionário pra avaliação de qualidade de vida a evolução dos animais tratados;
- Validar o potencial terapêutico do uso de células-tronco de saco vitelino e polpa dentária canina, nos pacientes portadores de displasia coxofemoral;
- Avaliar através de radiografias a evolução da osteoartrose, dos animais portadores de displasia coxofemoral, tratados com células-tronco mesenquimais de saco vitelino e polpa dentária canina.
- Através de exame de sangue (hemograma completo) avaliar as possíveis complicações hematológicas decorrentes da terapia celular dos animais tratados;
- Analisar o líquido sinovial para observar possíveis alterações articulares decorrentes da terapia celular nos animais tratados com células-tronco mesenquimais de saco vitelino e polpa dentária canina.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cultivo de células do saco vitelino de fetos caninos

As células de saco vitelino foram obtidas do banco de células do Laboratório de Células-Tronco do setor de Anatomia, departamento de Cirurgia da FMVZ-USP. Estas células já foram previamente coletadas, caracterizadas e armazenadas pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores (WENCESLAU, 2009).

Vials de células foram previamente descongelados, centrifugados e ressuspensos em meio de cultura adequado para expansão das culturas celulares.

Todas as células foram cultivadas em garrafas de poliestireno de 25cm² e incubadas a uma temperatura de 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em meio Alpha Mem (LGCBio), suplementado com 10% de soro fetal bovino (LGCBio) , 1% de antibiótico Penicilina-Estreptomicina (Sigma) e 1% de MEM NEAA (Gibco).

As células do saco vitelino *in vitro*, por apresentarem características de adesão ao substrato, necessitam ser submetidas ao processo de desagregação enzimática, à medida que atingem confluência (80%), para serem expandidas, quando necessário. A dissociação desta tem início com a retirada do meio de cultivo existente na garrafa; estas serão posteriormente lavadas duas vezes com solução de PBS-L, para a retirada de todo o resíduo do meio de cultivo. Posteriormente será adicionado 1ml de tripsina a 0,25% permanecendo encubadas por 5 minutos a 37°C.

Após este período foi adicionado 5ml de meio de cultivo suplementado com SFB, para a inativação da tripsina; toda suspensão celular será aspirada e transferida para um tubo tipo falcon com 5ml de meio de cultivo. Em seguida os tubos foram centrifugados 1000rpm por 5 minutos.

De acordo com as necessidades deste projeto as células foram subcultivadas para expansão ou centrifugadas e ressuspensas em solução fisiológica para aplicação nos animais (Figura 1).

Figura 1 - Cultura de células de saco vitelino

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Em A, observar explant de tecido vitelino de cão (seta) após 7 dias em cultura, observar células aderidas ao seu redor. Aumento de 10x.

5.2 Cultivo de células de polpa dentária canina

Para este projeto foram utilizadas células-tronco mesenquimais derivadas de dentes decíduos de cães. As células foram provenientes do banco de células do Laboratório de Células-Tronco do Departamento de Cirurgia, setor de Anatomia da FMVZ-USP, obtidas no projeto intitulado “Avaliação da terapia celular com células de polpa dentária no tratamento do osteossarcoma canino”, registrado sob o protocolo n.2303/2011. Estas células foram previamente caracterizadas e avaliadas quanto ao seu potencial tumorigênico.

As células foram acondicionadas em garrafas de cultura contendo meio de cultivo Alpha-MEM (LGC Biotecnologia), suplementados com 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia), 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco) e 1% de antibiótico (Penicilina-Streptomicina) (LGC Biotecnologia) e acondicionadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para aderência e proliferação celular (Figura 2).

Figura 2 - Cultura de célula de polpa dentária

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Observar morfologia fibroblastóide e a confluência das células aderidas ao plástico.
Aumento de 10x.

5.2.1 Preparação das células para aplicação terapêutica

Após proliferação das culturas de células de saco vitelino de cão e polpa dentária, as células foram devidamente lavadas com PBS 1x estéril, tripsinizadas, contadas e ressuspensas em solução salina para aplicação. Para cada animal, foi aplicado 1×10^7 células em um volume de 500 μ l, com auxílio de uma seringa de insulina.

5.3 Seleção dos casos clínicos – critérios de inclusão do animal no estudo

Foram escolhidos 16 cães, de proprietários provenientes de várias clínicas veterinárias particulares da região de Indaiatuba-SP, com displasia coxofemoral que após lerem o termo de consentimento e concordar com todas as fases da pesquisa foram incluídas na mesma.

Os animais selecionados apresentaram os critérios a seguir:

- Displasia coxofemoral bilateral;
- Capacidade de deambulação normal;
- Nenhuma outra patologia ortopédica concomitante;
- Sem distinção de idade, raça, sexo e peso.

Após a seleção os animais foram examinados (Quadro 1).

Quadro 1 - Animais selecionados para o estudo

Paciente	Claudicação	Atrofia muscular	Dor sentar/levantar	Mudança de hábitos diários
Lulli, Yorkshire, F	P	P	A	A
Ariel, (SRD), M	P	P	A	A
Nara, SRD, F	P	P	A	A
Pepita, Cocker, F	P	P	P	P
Max, Pastor Alemão, M	P	P	P	P
Petit, Lhasa apso, M	P	P	A	A
Luna, SRD, F	P	P	A	A
Bier, Labrador, F	P	P	P	P
Rany, Rottweiler, F	P	P	P	P
Brenda, Labrador, F	P	P	P	A
Janis, Pastor Alemão, F	P	P	A	P
Donatella, Golden Retriever, F	P	P	A	A
Thor, Pastor Alemão, M	P	P	P	P
Maya, Terra Nova, F	P	P	A	A
Vick, SRD, F	P	P	A	A
Chiara, Golden Retriever, F	P	P	P	P

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: SRD (Sem raça definida), P (presente), A (ausente), M (macho), F (fêmea).

5.4 Divisão dos grupos e metodologia de aplicação celular

Os cães foram divididos aleatoriamente por sorteio em grupo 1 (A e B) e grupo 2 (C e D) de 08 animais (Quadro 2), foram realizadas três aplicações celulares com intervalo de 30 dias (dia 0, 30 e 60) e uma avaliação controle 30 dias após a última aplicação celular (dia 90):

Grupo 1 A (Quadro 2): aplicação de solução salina intra-articular coxofemoral bilateral (0,5ml), realização de hemograma, análise de líquido sinovial, Rx simples nos dias 0, 30 e 60, dia 90 realização de hemograma, análise de líquido sinovial e Rx simples.

Quadro 2 - Grupo 1 (A) referente ao grupo controle do tratamento com célula de saco vitelino

Animal	Idade	Raça	Peso	Diagnóstico
A1	10 anos	Yorkshire	5,5 Kg	Displasia coxofemoral grave (E // HD.+++)
A2	5 anos	SRD	29 Kg	Displasia coxofemoral grave (E // HD.+++)
A3	6 anos	SRD	34 Kg	Displasia coxofemoral moderada (D // HD.+++)
A4	7 anos	Cocker	12kg	Displasia coxofemoral grave (E // HD.+++)

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Animais sorteados para integrar o grupo 1 (A), correspondente ao grupo controle.

Grupo 1 B (Quadro 3): aplicação de célula tronco de saco vitelino intra-articular coxofemoral bilateral (0,5ml/ 1×10^7), realização de hemograma, análise de líquido sinovial, Rx simples nos dias 0, 30 e 60, dia 90 realização de hemograma, análise de líquido sinovial, Rx simples.

Quadro 3 - Grupo 1 (B) referente ao grupo tratamento com células de saco vitelino

Animal	Idade	Raça	Peso	Diagnóstico
B1	8 anos	Pastor Alemão	35 Kg	Displasia coxofemoral grave (E // HD.+++)
B2	4 anos	Lhasa-Apso	10 Kg	Displasia coxofemoral leve (C // HD.+)
B3	9 meses	SRD	22 Kg	Displasia coxofemoral grave (E // HD.+++)
B4	10 anos	Labrador	25 Kg	Displasia coxofemoral grave (E // HD.+++)

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Animais sorteados para integrar o grupo 1 (B), correspondente ao grupo tratamento com células tronco de saco vitelino canino.

Grupo 2 C (Quadro 4): aplicação de solução salina intra-articular coxofemoral bilateral (0,5ml), realização de hemograma, análise de líquido sinovial, Rx simples nos dias 0, 30 e 60, dia 90 realização de hemograma, análise de líquido sinovial, Rx simples.

Quadro 4 - Grupo 2 (C) referente ao grupo controle do tratamento com células de polpa dentária

Animal	Idade	Raça	Peso	Diagnóstico
C1	10 anos	Rottweiler	29 Kg	Displasia coxofemoral grave (E // HD.+++)
C2	7 anos	Labrador	54 Kg	Displasia coxofemoral grave (E // HD.+++)
C3	4 anos	Pastor Alemão	23 Kg	Displasia coxofemoral leve (C//H.D.+)
C4	1,4 anos	Golden Retriever	30 Kg	Displasia coxofemoral grave (E // HD.+++)

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Animais sorteados para integrar o grupo 2 (C), correspondente ao grupo controle.

Grupo 2 D (Quadro 5): aplicação de célula tronco de polpa dentária intra-articular coxofemoral bilateral (0,5ml/ 1×10^7), realização de hemograma, análise de líquido sinovial, Rx simples nos dias 0, 30 e 60, dia 90 realização de hemograma, análise de líquido sinovial, Rx simples.

Quadro 5 - Grupo 2 (B) referente ao grupo tratamento com células de polpa dentária

Animal	Idade	Raça	Peso	Diagnóstico
D1	13 anos	Pastor Alemão	29 Kg	Displasia coxofemoral grave (E//H.D.+++)
D2	3 anos	Terra Nova	54 Kg	Displasia coxofemoral moderada (D//H.D.++)
D3	7 anos	SRD	23 Kg	Displasia coxofemoral leve (C//H.D.+)
D4	3 anos	Golden Retriever	30 Kg	Displasia coxofemoral grave (E//H.D.+++)

Fonte: Bendetti (2015)

Legenda: Animais sorteados para integrar o grupo de tratamento com células de polpa dentária canina.

Para a avaliação dos resultados adotamos o estudo temporal no dia 0, 30, 60 e 90 dias de tratamento. Foram coletados os dados de anamnese do animal e exame físico. Para análise dos aspectos físicos, foi realizado teste de Ortolani, avaliação do escore de claudicação e escore de atrofia muscular. Foram avaliados também os exames laboratoriais, como hemograma completo e exame do líquido sinovial. Os aspectos radiográficos da evolução do tratamento foram realizados por radiografias da articulação coxofemoral. Um questionário de avaliação de qualidade de vida foi preenchido pelos proprietários. Todas as avaliações citadas eram realizadas a todo tempo do tratamento citado, obtendo então quatro avaliações de cada paciente sobre cada item.

Os animais não tinham nenhuma restrição durante o tratamento e suas avaliações, eram instruídas que o mesmo não poderia fazer uso de nenhuma medicação que pudesse atrapalhar ou mesmo prejudicar o estudo em questão. Os proprietários assinaram termo de compromisso (Anexo A) em que afirmaram estar de acordo com o procedimento e cientes de todos os riscos inerentes à cirurgia e aplicação de células-tronco.

Os animais A4, C1 e D1 desistiram do tratamento em fases diferentes do projeto.

5.5 Exames físicos

A avaliação dos aspectos físicos foi realizada através de questionários onde se avaliou o escore de atrofia muscular, o escore de claudicação, teste de Ortolani e questionário de qualidade de vida.

5.5.1 Escore de atrofia muscular

Para a análise destes dados foi atribuída uma nota de 0 a 4 que classifica os vários graus de atrofia muscular em todas as datas de avaliação (Quadro 6).

Quadro 6 - Escores de avaliação de atrofia muscular

Classificação	Atrofia muscular
0	Ausente
1	Discreta
2	Moderada
3	Severa
4	Muito severa

Fonte: Ferrigno (2007)

5.5.2 Escore de claudicação

A análise deste escore foi obtida através de uma avaliação em todos os tempos de tratamento onde era atribuída uma nota de 0 a 4 as quais englobam todos os tipos de claudicação mensuráveis (Quadro 7).

Quadro 7 - Escores de avaliação de claudicação

Classificação	Claudicação na marcha
0	Ausente
1	Intermitente
2	Discreta e contínua
3	Moderada e contínua
4	Severa

Fonte: Hudson et al (2004)

5.5.3 Teste de Ortolani

Este teste tem por finalidade avaliar o deslocamento da cabeça do fêmur em relação ao acetábulo ao se realizar uma manobra de rotação e abdução da articulação coxofemoral, e por consequência avaliar a dor articular. É atribuída uma nota de 0 a 4 conforme os sinais observados dispostos no quadro 8 abaixo.

Quadro 8 - Escores de avaliação de dor à rotação e abdução da articulação coxofemoral (Teste de Ortolani)

0	Ausência de crepitação à abdução e rotação articular, sem sensibilidade dolorosa
1	Crepitação à abdução e rotação articular, sem sensibilidade dolorosa
2	Crepitação à abdução e rotação articular, com discreta sensibilidade dolorosa
3	Crepitação à abdução e rotação articular, com moderada sensibilidade dolorosa
4	Crepitação à abdução e rotação articular, com severa sensibilidade dolorosa

Legenda: Avaliação do teste de Ortolani por quatro escores e suas respectivas legendas

5.5.4 Questionário de qualidade de vida

Para esta análise os proprietários sem saber a qual grupo seu animal pertencia responderam um questionário com perguntas sobre os hábitos diários de seu animal (Quadro 9) e se estes poderiam estar sendo afetados pela displasia coxofemoral e consequentemente pelos tratamentos de estudo, sendo 12 o valor mínimo e 48 como sendo considerada uma ótima qualidade de vida.

Quadro 9 - Questionário para avaliação de qualidade de vida dos animais

Nº	Questão	Nota
1	Você acha que a doença atrapalha a vida do seu animal?	☐ Muito-1 ☐ Muito-2 ☐ Pouco-3 ☐ Não-4
2	Você acha que seu animal sente dor?	☐ Sempre-1 ☐ Frequentemente-2 ☐ Raramente-3 ☐ Não-4
3	O seu animal tem vômitos?	☐ Sempre-1 ☐ Frequentemente-2 ☐ Raramente-3 ☐ Não-4

Nº	Questão	Nota
4	Como está o intestino do seu animal?	☐ Péssimo-1 ☐ Ruim-2 ☐ Quase normal-3 ☐ Normal-4
5	O seu animal tem apetite?	☐ Sempre-1 ☐ Frequentemente-2 ☐ Raramente-3 ☐ Está normal-4
6	O seu animal se cansa facilmente?	☐ Sempre-1 ☐ Frequentemente-2 ☐ Raramente-3 ☐ Está normal-4
7	O seu animal continua mantendo seus hábitos diários normalmente?	☐ Nunca mais fez-1 ☐ Raramente-2 ☐ Frequentemente-3 ☐ Está normal-4
8	Como está o sono do seu animal?	☐ Muito ruim-1 ☐ Ruim-2 ☐ Bom-3 ☐ Normal-4
9	Quanta atenção seu animal está dando para a família?	☐ Está indiferente-1 ☐ Pouca atenção-2 ☐ Aumentou muito (carente)-3 ☐ Normal-4
10	O seu animal se posiciona sozinho para fazer xixi ou cocô?	☐ Nunca mais conseguiu-1 ☐ Raramente consegue-2 ☐ Às vezes consegue-3 ☐ Consegue normalmente-4
11	Como está o comportamento do seu animal?	☐ Totalmente alterado-1 ☐ Episódios de alteração-2 ☐ Mudou pouco-3 ☐ Normal-4
12	O seu animal manteve os hábitos de higiene (se lamber, etc.)?	☐ Antes-1 ☐ Raramente-2 ☐ Menos que antes-3 ☐ Está normal-4

Fonte: Ferrigno et al. (2007)

Legenda: Avaliação dos animais por pontuação mínima de 12 e máxima de 48 pontos.

5.6 Exames complementares

Os animais submetidos ao tratamento enviaram previamente um exame radiográfico recente (menos de um ano) comprovando a displasia coxofemoral bilateral e eram orientados a ter uma avaliação pré-operatória por seu Médico Veterinário particular, esta etapa não era realizada pelos autores do projeto.

5.6.1 Técnica radiográfica simples

Para a realização das radiografias da articulação coxofemoral, foi feita uma projeção, crânio-caudal. A técnica radiográfica foi adequada através da relação quilovoltagem, miliamperagem e espessura da área corporal a ser radiografada. Todos os exames de radiologia foram feitos pela Médica Veterinária Daniela Amstalden, com o aparelho de raios-x marca Agfa, modelo CR10-X.

5.6.2 Exames laboratoriais

- Hemograma completo (Quadro 10) para avaliação sistêmica de alguma reação hematológica desencadeada pela aplicação celular (Equipamento: Roche Sysmmex poch-100i);

- Análise líquido sinovial (Quadro 11) para avaliação do ambiente intraarticular durante todas as fases da pesquisa (Equipamento: Bioplus 200).

Todos os exames de patologia clínica foram feitos pela Médica Veterinária Andréa D.B. Rangel de Oliveira, sendo o hemograma realizado por meio do equipamento Roche Sysmmex poch-100i, e os testes bioquímicos pelo equipamento Bioplus 200.

Quadro 10 - Tabela de referência do hemograma dos animais testados neste estudo

ERITROGRAMA	Referência	Unidade
Eritrócitos	5,0 a 8,0	X10 ⁹ /mL
Hemoglobina	12 a 18	%
Hematócrito	37 a 54	%
Proteína plasmática	5,5 a 8,0	g/Dl
LEUCOGRAMA	Referência	Unidade
Leucócitos totais	6.000 a 15.000	10 ³ /mL
Eosinófilos	0 a 750	10 ³ /mL
Linfócitos	1.500 a 5.000	10 ³ /mL
Neutrófilos	3.000 a 11.800	10 ³ /mL
Plaquetas	200.000 a 500.000	10 ³ /mL

Fonte: Benedetti (2015)

Quadro 11 - Tabela de referência para os valores de análise do líquido sinovial de cães

Exame físico		
Cor		
Odor		
Aspecto		
Coagulabilidade		
Exame Químico	Referência	Unidade
Proteínas	2 a 2,5	g/dl
Densidade	1010-1020	
Sangue oculto	Presente/Ausente	
Contagem de células	Referência	Unidade
Hemácias		X10 ⁶ /mL
Células nucleadas	250-3000	10 ³ /mL
Exame citopatológico		
Conclusão		

Fonte: Benedetti (2015)

5.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (Teste two-tailed/teste t ou Teste Tukey-kramer/Anova) sendo comparados os grupos controle e tratamento, os grupos tratamentos e os grupos tratamentos ao longo do tempo. Foram considerados valores estatisticamente significantes aqueles onde $p \leq 0,05$.

5.8 Procedimento anestésico e controle da dor

Foi realizada reposição hídrica com fluido de Solução fisiológica (Bolsa de 500 ml, Halexstar Ind.Farm. Br 153 Km 3 Goiânia-GO), 10ml/kg/hora em todo o procedimento, medicação pré- anestésica com 0,5 mg/Kg de cloridrato de petidina (Ampola 50mg/ml, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu – São Paulo – Brasil), sedação com 3mg/kg de Propofol (Propovan 10mg/ml, frasco 20 ml, Cristália Prod. Qui. e Farm. Rod. Itapira – Línioia – SP, Brasil).

5.9 Aplicação de célula-tronco de saco vitelino e de polpa dentária canina em cães com displasia coxofemoral

Os proprietários eram orientados a deixarem seus animais de jejum hídrico e alimentar 8h antes do procedimento. Os animais eram submetidos a uma sedação para realização de todo o procedimento proposto. Após se atingir o relaxamento muscular desejado era realizado o exame radiográfico.

No local da aplicação, foi realizada uma tricotomia ampla na região da articulação coxofemoral, tendo como orientação o trocânter maior do fêmur, seguido de uma antissepsia com clorexidine alcoólico 0,5%.

Após a localização dos pontos anatômicos da articulação foi realizado a introdução de forma percutânea de uma agulha de Thuoy de 52x37 até a articulação coxofemoral com a ajuda de um auxiliar para realizar a abdução do membro quando

necessário para aumentar o espaço articular e permitir a perfeita introdução da agulha. Constatada a presença da mesma no espaço articular era realizado a coleta de líquido sinovial com o acoplamento de uma seringa de 20 ml no mandril da agulha e aspiração do líquido (Figura 3 A). Da mesma maneira era realizada com uma seringa de 1 ml a aplicação de cerca de 0,5 ml de solução salina (grupos A e C) e célula-tronco (Figura 3 B), 1×10^7 células (grupos B e D). O mesmo procedimento era realizado no lado contralateral do animal. Por último era coletada amostra de sangue por punção venosa da jugular e acondicionado em frascos com EDTA, assim como o líquido sinovial.

Figura 3 - Coleta de líquido sinovial e aplicação celular intra-articular coxofemoral

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Animal B4, sedado, sendo realizada a coleta de líquido sinovial para análise (A) e em seguida aplicação de célula tronco de saco vitelino intra-articular coxofemoral.

6 MEDICAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

1) Enrofloxacino (Baytril 10%, Laboratório Bayer S.A, São Paulo-SP, Brasil) na dose única de 5mg/kg.

2) Dipirona (Algivet, laboratório Vetnil Ind. e Com. De Pro. Vet. Ltda, Louveira - São Paulo – SP, Brasil), na dose única de 1ml por animal.

7 RESULTADOS

Para a escolha dos animais utilizados neste trabalho não foi levado em conta a idade, raça, sexo e peso. Foram selecionados 16 animais, sendo que destes, 3 desistiram, sendo 13 animais acompanhados por 90 dias. As avaliações eram realizadas mensalmente tendo os quesitos teste de Ortolani, grau de atrofia muscular e escore de claudicação avaliados, o quesito qualidade de vida avaliado pelo proprietário do animal, hemograma e líquido sinovial por um único Médico veterinário, assim como as imagens radiográficas.

7.1 Teste de Ortolani

A análise estatística dos dados obtidos e comparados entre os animais tratados com células de saco vitelino (SV) e células de polpa dentária (PD) apontaram diferença estatística favorável ao tratamento com SV a partir do dia 30, sendo mais evidente no dia 90 (Teste two-tailed/teste t , $p = 0,073$). Demonstrando que o tratamento com SV foi mais efetivo para controle da dor na abdução e rotação articular.

Quando analisado o tratamento do grupo PD ao longo do tempo, houve diferença estatística significativa, sendo a diferença mais evidente aos 90 dias (Teste Tukey-kramer/ Anova $p=0,0009$). Isso demonstra que os animais tratados aos 90 dias apresentavam menor dor a abdução e rotação articular do que no início da pesquisa.

7.2 Qualidade de vida

Quanto aos dados obtidos referente à qualidade de vida dos animais deste estudo, houve diferença estatística entre os grupos SV e PD, sendo que este último apresentou melhores resultado nos dias 0, 30 e 60 dias de avaliação (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,0587$). Isto demonstra que segundo a avaliação dos proprietários

os animais tratados com PD apresentaram uma resposta clínica melhor aos animais tratados com SV.

Os dados analisados para o questionário de qualidade de vida do grupo tratado com SV apontou uma diferença estatística significativa quando comparado às datas 0, 30, 60 e 90 (Teste Tukey-kramer/Anova $p=0,0001$). Obtendo uma melhora significativa aos 90 dias, apresentando avaliação considerada boa por seus proprietários com escore igual a 46 pontos.

A análise estatística para dos dados dispostos no dia 0 entre os grupos SV e controle (C) apontou uma diferença estatística superior para os animais do grupo C, sendo que estes apresentavam um escore de qualidade de vida superior aos animais do grupo comparado (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,0016$).

7.3 Hemograma

Comparando os grupos de tratamento PD e SV houve diferença significativa quando comparado os dados de plaquetas no dia 0 (Quadro 8), porém os dados dos dois grupos se mantinham dentro dos valores aceitáveis para a espécie (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,001$).

Quando os valores entre os animais do grupo SV e C foram comparados, houve diferença significativa para valores de hematócrito nos dias 0 e 90, sendo os animais do grupo controle portadores dos valores mais próximos dos limites aceitáveis para a espécie (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,0228/p=0,0148$). A comparação entre os valores das plaquetas entre estes mesmos grupos apresentou diferença significativa no dia 0, sendo o grupo SV com os valores mais próximos dos valores de referência para a espécie (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,0772$).

Entre o grupo PD e C houve diferença significativa na comparação dos valores de plaquetas nos dias 0 e 90, sendo que os valores mais próximos dos aceitáveis para a espécie eram dos animais do grupo controle, em ambas as datas citadas (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,0883/p=0,0219$).

7.4 Análise do líquido sinovial

A análise estatística dos dados obtidos através do exame do líquido sinovial apontou uma diferença significativa quando comparada as proteínas e células nucleadas entre os grupos SV e PD no dia 0. Os animais do grupo SV apresentavam valores superiores aos animais do grupo PD, porém ainda assim dentro dos limites de referência para a espécie (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,0036/p=0,0800$).

O valor da densidade do líquido sinovial apresentou uma diferença significativa estatisticamente quando comparado o dia 90 entre os grupos PD e C, sendo que os valores de PD se apresentam com maior alteração em comparação com os valores de referência para a espécie em relação ao grupo comparado (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,0115$).

Os valores referentes às células nucleadas entre os grupos PD e C também apresentou uma diferença estatística no dia 0, sendo os dois valores dentro dos limites estabelecidos para a espécie, porém os animais do grupo PD apresentavam valores maiores que o grupo comparado (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,0734$).

7.5 Escore de atrofia muscular

Nos dados obtidos através desta avaliação houve somente diferença estatística entre o grupo C e PD no dia 90, onde os animais do grupo C apresentavam um escore melhor de avaliação em relação ao grupo comparado (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,0493$). Este fato pode estar relacionado com um aumento no grau de claudicação dos grupos PD após a segunda aplicação celular, fato este que não se repetiu após a terceira aplicação, porém influenciou nesta diferença estatística entre os grupos.

7.6 Escore de claudicação

Para os dados obtidos para avaliação deste escore somente houve uma diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos SV e C no dia 60, havendo um melhor escore de avaliação entre os animais do grupo C (Teste two-tailed/ teste t , $p=0,0278$). Este fato pode-se explicar por um animal do grupo SV ter apresentado uma piora clínica nesta data para este escore, que não foi observado na data subsequente, porém foi suficiente para haver uma diferença estatística entre os grupos para esta data. No final do tratamento não foi observado diferença estatística entre os grupos.

7.7 Avaliação radiográfica

A avaliação radiográfica foi instituída neste estudo para poder inicialmente caracterizar os diferentes graus de displasia dos animais estudados. Durante os tempos de tratamento manteve-se a realização deste exame para poder avaliar alguma alteração óssea nas articulações coxofemoral, podendo ser esta alteração positiva ou negativa.

No final do estudo observou-se que não houve nenhuma alteração óssea em nenhum dos grupos, não havendo uma piora radiográfica no grau de displasia dos animais tratados com SV ou PD (Figura 4, 5, 6 e 7).

Figura 4 - Exame radiográfico do animal B4 durante o tratamento

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Em A, exame radiográfico do animal B4, do grupo 1, dia 0, tratado com células de saco vitelino. Em B no dia 90 o mesmo animal sem alterações radiográficas.

Figura 5 - Exame radiográfico do animal A2 durante o tratamento

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Em A, exame radiográfico do animal A2, do grupo 1, dia 0, grupo controle. Em B no dia 90 o mesmo animal sem alterações radiográficas.

Figura 6 - Exame radiográfico do animal D4 durante o tratamento

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Em A, exame radiográfico do animal D4, do grupo 2, dia 0, tratado com células de polpa dentária. Em B no dia 90 o mesmo animal sem alterações radiográficas.

Figura 7 - Exame radiográfico do animal C3 durante o tratamento

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Em A, exame radiográfico do animal C3, do grupo 2, dia 0, grupo controle. Em B no dia 90 o mesmo animal sem alterações radiográficas.

7.8 Avaliação individual dos animais tratados

Os animais tratados com as células de saco vitelino e polpa dentária foram avaliados e os resultados individuais encontrados dispostos no quadro 12.

Quadro 12 - Avaliação individual dos animais tratados com células-tronco no dia 90 de tratamento

Grupo SV	Teste de Ortolani	Qualidade de vida	Escore de claudicação	Escore de atrofia muscular	Hemograma	Líquido sinovial
B1, Pastor alemão, 8a, 35kg
B2, Lhasa-Apso, 4a, 10kg
B3, SRD, 9m, 22kg
B4, Labrador, 10a, 25kg
Grupo PD						
D2, Terra Nova, 3a, 54kg
D3, SRD, 7a, 23kg
D4, Golden Retriever, 30 kg

Fonte: Benedetti (2015)

Legenda: Avaliação física e laboratorial dos animais tratados com células de saco vitelino e polpa dentária no dia 90 de tratamento. A seta voltada para cima indica melhora do escore no dia 90 em relação ao dia 0, a barra horizontal indica estabilidade do quadro no dia 90 em relação ao dia 0 e a seta voltada para baixo indica piora do escore no dia 90 em comparação ao dia 0.

O escore de claudicação e escore de atrofia muscular apresentaram resultados pouco significativos em todos os grupos, sendo este último inalterado em todos os tempos avaliados.

Os testes de Ortolani e questionário de qualidade de vida foram as avaliações que apresentaram maior representatividade nos animais tratados.

Dentre o escore de qualidade de vida o animal B2 apresentava no dia 0 um escore de 32, sendo no dia 90 o escore de 45. O animal B3 apresentava no dia 0 o escore de 35 e no dia 90 escore de 41 e o animal B4 apresentava escore de 35 no dia 0 e no dia 90 esse escore foi de 46, sendo Foram mudanças de escore muito significativas indicando uma melhora clínica nos animais tratados.

Quando se avalia o teste de Ortolani o animal B4 apresentava um escore de 4 e no dia 90 esse escore era de 0, já o animal D2 apresentava um escore de 3 no dia 0 e dia 90 esse escore foi de 1. Todos os resultados apresentando melhoras significativas nos animais tratados.

Avaliando individualmente os animais tratados podemos comprovar os benefícios desta terapia proposta em animais com displasia coxofemoral.

8 DISCUSSÃO

Foram escolhidas para este estudo duas terapias com células-tronco diferentes, célula de saco vitelino e polpa dentária para tratamento de doença articular no modelo canino. A displasia coxofemoral foi a doença articular de escolha por causar a maior prevalência de afecções articulares gerando doença articular degenerativa em cães no mundo todo (LEPPANEN; SALONIEMI, 1999; COOPMAN, et al., 2008; KANEENE; MOSTOSKY; MILLER, 2009). É caracterizada por uma formação anormal da articulação coxofemoral com diferentes graus de luxação e subluxação, sendo sua prevalência maior em animais de raças grandes e gigantes, sua causa é multifatorial e os tratamentos são diversos e controversos (COOK; TOMLINSON; CONSTANTINESCU, 1996; ETTINGER; FELDMAN, 2004; BARROS et al., 2008).

Os cães como modelos experimentais de tratamentos com células-tronco têm propiciado informações relevantes para terapias em humanos e informações pré-clínicas importantes tanto para o tratamento em medicina humana como veterinária (HORN et al., 2004; MONTEIRO; ARGOLO-NETO; DEL CARLO, 2010; LIMA et al., 2012). Outro ponto importante é o grande crescimento da terapia celular na clínica veterinária para o tratamento de diversas doenças caninas (BYDLOWSKI et al., 2009; COLLEONI et al., 2009; WENCESLAU, 2009; MARTINS et al., 2014) seja em tecido ósseo ou em tecidos moles (THARASANIT et al., 2011). As células-tronco mesenquimais demonstraram resultados promissores em estudos pré-clínicos e clínicos em doenças do sistema cardiovascular, pulmonar, em traumas medulares, bem como no sistema nervoso central e em defeitos ósseos cartilagosos (BEYER; DA SILVA MEIRELLES, 2006; LE BLANK et al., 2006; FOROSTYAK; JENDELOVA., 2013; LEE et al., 2013).

O ineditismo do uso de células-tronco de polpa dentária canina e células-tronco do saco vitelino canino em terapia celular nas doenças articulares foi um dos objetivos deste estudo visando comparar as duas terapias como uma nova conduta clínica nestes casos. As células-tronco de origem fetal são facilmente acessíveis a partir de tecido extra embrionário, geralmente descartado após o nascimento e que podem ser obtidos através do saco vitelino (WENCESLAU, 2011), placenta (PAROLINI; CARUSO, 2011), âmnion (URANIO et al., 2011) e córion (FUKUCHI,

2004). Células-tronco de origem fetal possuem baixa resposta imunológica, uma vez que estão na interface materno-fetal (LI et al., 2005; MIHU et al., 2009), apresentam um crescimento rápido e boa plasticidade (MIKI et al., 2005), podendo substituir as células-tronco adultas e embrionárias na terapia celular (MARCUS; WODBURY, 2008).

Os resultados hematológicos dos animais tratados não demonstrou nenhuma alteração significativa, comprovando a baixa resposta imunológica.

Além disso, são capazes de diferenciação em células específicas como cardiomiócitos, além das já estabelecidas propriedades de diferenciação em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas (KIM et al., 2007), tornando essas células uma fonte alternativas de células multipotentes (YEN et al., 2005). Em meio de cultura específico células progenitoras de saco vitelino foram capazes de se diferenciar em tecidos ósseos, cartilaginoso e muscular (WENCESLAU, 2009). Diante destes resultados acreditamos que as células de saco vitelino por apresentar a capacidade de diferenciação osteogênica e condrogênica eficiente possam ter colaborado positivamente para os resultados obtidos neste trabalho.

Outra importante fonte estudada são as células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (BMSCs), elas tem sido alvo de importantes pesquisas científicas em função das suas relevantes propriedades para uso na terapia celular, como por exemplo sua grande habilidade de diferenciação em osteoblastos (STREM et al., 2005). Podemos correlacionar os resultados obtidos para este tipo celular com os resultados obtidos com terapia com célula de saco vitelino visto que as duas linhagens tem um comprometimento com a hematopoiese em diferentes fases do desenvolvimento. Durante o desenvolvimento, células-tronco do saco vitelino migram temporariamente para o fígado fetal e finalmente localizam-se na medula óssea, local permanente de formação de células sanguíneas. Com essa partida de células-tronco o saco vitelino se atrofia progressivamente ao longo da gestação (HOLLANDS, 1987). As BMSCs possuem grande habilidade de diferenciação em osteoblastos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, o que levou a sua utilização clínica em estudos pilotos para desordens ósseas hereditárias e deficiências osteogênicas em diferentes espécies animais (STREM et al., 2005; ZAMPROGNO, 2007; FONTES, 2009; OLIVEIRA et al., 2010; LIMA et al., 2012).

Queiroz et al. (2010) utilizou células de medula óssea para o tratamento da displasia coxofemoral em cães e não foi encontrada diferença estatística entre o

grupo controle e o tratamento, dado semelhante ao desta pesquisa, onde os animais tratados por terapia celular demonstraram melhora no grau de claudicação, no teste de Ortolani e principalmente da avaliação de qualidade de vida realizada pelos proprietários porém sem significância estatística.

Outra promissora fonte de célula-tronco mesenquimal foi descoberta por Gronthos et al. (2000) quando os autores isolaram células de polpa de dente humano e compararam com as células-tronco de medula óssea, apresentando heterogeneidade, multipotencialidade, capacidade de proliferação e de formação de colônias *in vitro*. Esses resultados demonstraram que a célula de polpa de dente poderia ser capaz de se proliferar e diferenciar, podendo reparar estruturas dentárias danificadas, induzir regeneração óssea e possivelmente tratar tecidos neurais lesados podendo também ser utilizada em terapia de doenças degenerativas (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003; SEO et al., 2008; KAWASHIMA, 2012; PORTDAR; JETHMALANI, 2015).

O fato do dente não ser um órgão vital, devido ao seu fácil acesso e por ser um tecido que normalmente seria descartado, ele se torna um grande atrativo para utilização em terapia celular. A extração do tecido pulpar é altamente eficiente, local de coleta fácil e suas células possuem ampla capacidade de diferenciação e interatividade com biomateriais, tornando ideal para reconstrução de tecidos (GRAZIANO et al., 2008). As células-tronco de polpa dentária já demonstraram em estudos anteriores a capacidade de se diferenciar não só em osteócitos, odontoblastos e adipócitos, mas também em linhagens como as neurais, se tornando um grande potencial na odontologia e na medicina regenerativa (SOUZA, 2008; HUANG; SNYDER; CHENG, 2008; ISHKITIEV et al., 2010). Kuo et al. (2010) afirmaram em um estudo que os fatores de crescimento secretados pelas BMSCs podem promover a regeneração do dente. Este estudo combinou a utilização das BMSCs com células do germe dentário (DBC) do segundo molar de suínos. Ficou demonstrado neste trabalho que as DBCs combinadas com as da medula óssea em arcabouço adequado podem regenerar dente neste modelo. No presente trabalho podemos confirmar o uso terapêutico das células de polpa dentária em cães com displasia coxofemoral, foi possível observar uma melhora clínica e de qualidade de vida dos animais tratados e sem a presença de qualquer tipo de resposta imunológica com essas células.

Um estudo americano randomizado, duplo cego, multicêntrico muito parecido com este estudo utilizou células-tronco derivadas do tecido adiposo em cães com displasia coxofemoral, porém os autores relatam uma diferença significativa nos resultados obtidos entre os dois grupos. Os animais do grupo tratamento apresentaram escore clínico pós-tratamento em todos os tempos para as avaliações realizadas positivas, sendo superior ao do grupo controle (BLACK et al., 2007).

Apesar do nosso estudo não apresentar diferença estatística entre o grupo controle e o tratamento, quando se faz a avaliação dos animais ao longo do tempo para o questionário de qualidade de vida fica evidente a eficácia clínica deste tratamento. Quando se comparam os resultados estatísticos significantes entre os dois grupos de tratamentos encontrados no teste de Ortolani e de qualidade de vida, ficam evidentes as diferenças positivas no tratamento com células de saco vitelino.

Uma série de publicações fornecem evidências do sucesso terapêutico com célula-tronco em terapias para tendões, lesões ligamentares e doença articular degenerativa em outras espécies (MURPHY; FINK; HUNZIKER, 2003; NATHAN; DAS DE; THAMBYAH, 2003; GUILAK; AWAD; FERMOR, 2004; LUYTEM, 2004; MARX et al., 2014).

Schauwer e Soom (2007) relatam que a expansão de células-tronco mesenquimais de diferentes origens como medula óssea, sangue periférico, anexos embrionários, entre outros, em várias espécies, tem sido muito estudada pelo fato de se diferenciarem em várias linhagens, e representam uma população promissora para as terapias celulares com base em medicina veterinária.

Há um consenso geral na literatura consultada dos benefícios da terapia celular para as mais diversas patologias. Poucos são os trabalhos que utilizam a célula-tronco de polpa dentária e saco vitelino. São duas novas fontes de células-tronco de fácil obtenção, induz baixa reação imunológica no animal receptor e podem ser cultivadas e expandidas *in vitro* sem alteração de sua plasticidade. Neste trabalho podemos comprovar seu uso benéfico em patologias articulares na espécie canina, sendo comprovados os benefícios destes dois tipos celulares na displasia coxofemoral.

9 CONCLUSÃO

- Foi possível avaliar mediante escore de claudicação, escore de avaliação de atrofia muscular, teste de Ortolani e questionário pra avaliação de qualidade de vida a evolução dos animais tratados;
- Não houve diferença estatística relevante entre os grupos tratamentos e controle;
- Entre os grupos tratamento houve diferença estatística significativa em relação ao teste de Ortolani para o tratamento com células de saco vitelino;
- Avaliamos através de radiografias que não houve a evolução da osteoartrose dos animais portadores de displasia coxofemoral, tratados com células-tronco mesenquimais de saco vitelino e polpa dentária canina;
- Não observamos complicações hematológicas decorrentes da terapia celular dos animais tratados;
- Não observamos através da análise de líquido sinovial alterações articulares decorrentes da terapia celular nos animais tratados com células-tronco de saco vitelino e polpa dentária canina;
- Concluimos que os tratamentos propostos com células- tronco de polpa dentária e de saco vitelino é eficiente em animais com displasia coxofemoral.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J. W. The pathogenesis of canine hip dysplasia. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 22, n. 3, p. 503-511, 1992.
- ALLAN, G. Radiographic signs of joint disease. In: THRALL, D. E. **Textbook of veterinary diagnostic radiology**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2002. p. 187-207.
- ARNBJERG, J. Recent information about hip dysplasia. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 29, n. 4, p. 921-934, 1999.
- AUERBACH, R.; HUANG, H.; LU, L. Hematopoietic stem cell in the mouse embryonic yolk sac. **Stem Cells**, v. 14, p. 269-1820, 1996.
- AUERBACH, R.; WANG, S.; YU, D.; GILIGAN, B.; LU, L. Role of Endothelium in the control of mouse yolk sac stem cell differentiation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 22, n. 3, p. 333-338, 1998.
- AZIZI, S. A.; STOKES, D.; PROCKOP, D. J. Survival, migration and engraftment of bone marrow stromal cells into the striatum of the adult rats. **Experimental Neurology**, v. 153, n. 2, p. 374-375, 1998.
- BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R.S.; Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.8, n.3, p. 301-316, 2004.
- BARROS, G. S.; VIEIRA, G. L. T.; VIANNA, L. R.; TORRES, R. C. S. Frequência da displasia coxofemoral em cães da raça Pastor Alemão, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1557-1559, 2008.
- BARROS, S. V. S.; DEL CARLO, R. J.; VILORIA, M. I.; GALVÃO, S. R.; FILHO, A. M.; OLIVEIRA, D. R. Auto - enxerto percutâneo de medula óssea II. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 627-632, 2001.
- BELFIELD, W. O. Chronic subclinical scurvy and canine hip dysplasia. **Vetetary Medicine Small Animals Clinic**, v.71, p. 1399- 1403, 1976.
- BERGAMO, F. M. M.; IAMAGUTI, P.; BIASES, F. **Utilização do sulfato de condroitina em cães submetidos à acetabuloplastia e reconstituição do ligamento da cabeça do fêmur**. Botucatu-SP: FMVZ-UNESP, 2006.

BEYER, N. N.; DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansions and characterization. **Handbook Experimental Pharmacology**, v. 174, p. 249-282, 2006.

BJORKMAN, N. Placentação. In: DELLMA, H.; BROWN, E. N. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. p. 279.

BLACK, L. L.; GAYNOR, J.; GAHRING, D.; ADAMS, C.; ARON, D.; HARMAN, S.; GINGERICH, D. A.; HARMAN, R. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dog with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: A randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. **Veterinary Therapeutics**, v. 8, n. 4, p. 272-284, 2007.

BLISS, S.; TODHUNTER, R. J.; QUAAS, R.; CASELLA, G. W.; LUST, R. G.; WILLIAMS, A. J.; HAMILTON, S.; DYKES, N. L.; YEAGER, A.; GILBERT, R. O.; BURTON-WURSTER, N. I.; ACLAND, G. M. Quantitative genetics of traits associated with hip dysplasia in a canine pedigree constructed by mating dysplastic Labrador Retrievers with unaffected Greyhounds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 1029-1035, 2002.

BOCCHI, E.A.; FERREIRA, S.M.A. Células-tronco no tratamento das doenças cardiovasculares. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 14, n. 4, p. 2-9, 2005.

BOLLINGER, C.; DeCAMP, C. E.; STAJICH, M.; FLO, G. L.; MARTINEZ, S. A.; BENNET, R. L.; BEDCHUCKT, T. Gait analysis of dogs with dysplasia treated with gold bead implantation acupuncture. **Veterinary and Comparative Orthopaedics Traumatology**, v. 15, p. 116-122, 2002.

BOSSOLASCO, P.; MONTEMURROT, T.; COVA, L.; ZANGROSI, S.; CALZAROSSA, C.; BUIAIOTIS, S.; SOLIGO, D.; BOSARI, S.; SILANI, V.; DELILIER, G. L.; REBULLA, P.; LAZZARI, L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. **Cell Research**, v. 16, p. 329-336, 2006.

BRAUN, D.; LAUTERSACK, O.; SCHIMKE, E.; GENTSCH-BRAUN, D. Dorsale denervation der hufgelenhskapsel beim hund ergebnisse einer langzeitstudie. **Kleintierpraxis**, Hannover, v. 4, p. 185-244, 2003.

BRINKER, W. O.; PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. Tratamento das luxações coxofemorais. In: _____. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1999. Cap. 15, p. 394-433.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25-35, 2009.

CLAPP, D. W.; FREIE, B.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Y. Molecular evidence that in situ-transduced fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells give rise to medullary hematopoiesis in adult rats. **Blood**, v. 86, p. 2113-2122, 1995.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 8, p. 811-821, 2009.

COOK, J. L.; TOMLINSON, J. L.; CONSTANTINESCU, G. M. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of canine hip dysplasia. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinary**, v. 18, p. 853-867, 1996.

COOPMAN, F.; VERHOEVEN, G.; SAUNDERS, S. J.; DUCHATEAU, L.; VAN, P. H. Prevalence of hip dysplasia, elbow dysplasia and humeral head osteochondrosis in dog breeds in Belgium. **Veterinary Record**, v. 162, n. 22, p. 654-658, 2008.

CROOK, T.C. The effects of passive stretching on canine joint motion restricted by osteoarthritis in vivo. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REHABILITATION AND PHYSICAL THERAPY IN VETERINARY MEDICINE, 3., 2004, North Carolina. **Proceedings...** Raleigh: North Carolina State University, 2004. p. 207.

DAVIDSON, J. R.; KERWIN, S. C.; MILLIS, D. L. Reabilitação ortopédica, In: LEVINE, D.; MILLIS, D. L.; MARCELLIN-LITTLE, D. J.; TAYLOR, R. **Reabilitação e fisioterapia na prática de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2008. p. 136-143.

DEL CARLO, R. J. Células-tronco: células da esperança. **Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 11, n. 35, p. 60-68, 2005.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGOLO-NETO, N. M. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. **Ceres**, v. 56, n. 4, p. 446-450, 2009.

DENNIS, J. E.; CAPLAN, A. I. Bone marrow mesenchymal stem cells. In: SELL, S. **Stem cell handbook**. Totowa: Humana Press, 2004. p. 107-117.

DISSANAYAKA, W. L.; ZHU, X.; ZHANG, C.; JIN, L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2011.

DJOUAD, F.; PLENCE, P.; BONY, C.; TROPEL, P.; APPARAILLY, F.; SANY, J.; NOEL, D.; JORGENSEN, C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. **Blood Journal**, v. 102, n. 10, p. 3837-44, 2003.

DOCHEVA, D.; POPOV, C.; MUTSCHLER, W.; SCHIEKER, M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics

and the integrin system. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, p. 21-38, 2007.

DUELAND, R. T.; ADAMS, W. M.; FIALKOWSKI, J. P.; PATRICELLI, A. J.; MATHEWS, K. G.; NORDHEIM, E. V. Effects of pubic symphysiodesis in dysplastic puppies. **Veterinary Surgery**, v. 30, n. 3, p. 201-217, 2001.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 2156 p.

EVERTS, R. E.; HAZEWINKEL, H. A. W.; ROTHUIZEN, J.; VAN OOST, B. A. Bone disorders in the dog, A review of modern genetic strategies to find underlying causes. **Veterinary Quarterly**, v. 22, p. 63-70, 2000.

FERRIGNO, C. R. A.; SCHMAEDECKE, A.; OLIVEIRA, L. M.; ÁVILA, R. S. D.; YAMAMOTO, E. Y.; SAUT, J. P. E. 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, 2007a

FERRIGNO, C. R. A.; SCHMAEDECKE, A.; FERRAZ, V. C. M. Abordagem cirúrgica inédita para denervação acetabular em cães 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 61-63, 2007b.

FONTES, E. B. **Hidroxiapatita sintética associada ou não a fração total de células mononucleares na regeneração de osso alveolar de cães**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Santa Maria, 2009.

FOROSTYAK, S.; JENDELOVA, P.; SYKOVA, E. The role of mesenchymalstromal cells in spinal cords injury, regenerative medicine and possible clinical applications. **Biochimie**, v. 95, n. 1, p. 2257-2270, 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908413002721>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI, K. Human placenta derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cell**, v. 22, p. 649-658, 2004.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 257, p. 1433-1438, 2000.

GASSE, H. Zur innervation der kurgelenkkapsel beim hund. **Kleintierpraxis**, v. 41, p. 883-886, 1996.

GOLDSMITH, L.; LUST, G.; STEINETZ, B. Transmission of relaxin from lactating bitches to their offspring via suckling. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 258-265, 1994.

GRAZIANO, A.; D'AQUINO, R.; PAPACCIO, G.; LAINO, G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. **Stem Cell**, v. 4, n. 1, p. 21-26, 2008.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.

GUERREIRO, A.; WORFOLD, L.; HOLLAND, H. K.; GUO, G. R.; SHEEHAN, K.; WALLER, E. K. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. **Blood**, v. 90, p. 3444-3455, 1997.

GUILAK, F.; AWAD, H. A.; FERMOR, B. Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. **Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 389-399, 2004.

HAYNESWORTH, S. E.; BARBER, I. A. CAPLAN. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. **Bone**, v. 13, p. 69-80, 1992.

HEDHAMMAR, A.; OLSSON, S. E.; ANDERSON, S. A.; PERSSON, L.; PETERSSON, L.; OLAUSSON, A.; SUNDGREN, P. E. Canine hip dysplasia; study of heritability in 401 litter of German Shepherd Dogs. **Journal of American Medical Association**, v. 174, n. 9, p. 1012-1016, 1979.

HENRICSON, B.; NORBERG, I.; OLSSON, S. E. On the etiology and pathogenesis of hip dysplasia: a comparative review. **Journal of Small Animal Practice**, v. 7, p. 673-688, 1966.

HOLLANDS, P. Differentiation and grafting of haemopoietic stem cells from early post-implantation mouse embryos. **Development**, v. 99, p. 69-76, 1987.

HORN, P. A.; MORRIS, J. C.; NEFF, T.; KIEM, H. P. Stem cell gene transfer-efficacy and safety in large animal studies. **Molecular Therapy**, v. 10, p. 417-43, 2004.

HUANG, A. H.; SNYDER, B. R.; CHENG, P. H.; CHAW, A. W. Putative dental pulp derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. **Stem cells**, v. 26, n. 10, p. 2654-2663, 2008.

HUANG, A. H.; SNYDER, B. R.; CHENG, P. H. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. **Stem cells**, v. 26, n. 10, p. 7611-7616, 2008.

HUDSON, S.; HULSE, D. Benefit of rehabilitation for treatment of osteoarthritis in senior dogs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REHABILITATION AND PHYSICAL THERAPY IN VETERINARY MEDICINE, 3., 2004, North Carolina. **Proceedings...** Raleigh: North Carolina State University, 2004. p. 235.

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

IMPELLIZERI, J. A.; TETRICK, M. A.; MUIR, P. Effect of weight reduction on clinical signs of lameness in dogs with osteoarthritis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 7, p. 1089-1091, 2000.

INNES, J. F.; GORDON, C.; VAUGHAN-THOMAS, A.; RHODES, N. P.; CLEGG, P. D. Evaluation of cartilage, synovium and adipose tissue as cellular sources for osteochondral repair. **The Veterinary Journal**, v. 197 n. 3, p. 619-624, 2013.

ISHIKITIEV, N.; YAEAGAKI, K.; CALENIC, B.; NAKAHARA, T.; ISHIKAWA, H.; MITIEV, V.; HAAPASALO, M. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. **Journal of endodontics**, v. 36, n. 3, p. 469-474, 2010.

JAFREDO, T.; BOLLEROT, K.; SUGIYAMA, D.; GAUTIER, R.; DREVON, C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. **International Journal Developmental Biology**, v. 49, n. 2-3, p. 269-277, 2005.

JOHNSTON, S. A.; BUDSBERG, S.C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids for the management of canine osteoarthritis. **Veterinary of North America: small animal practice**, v. 27, n. 4, p. 841-856, 1997.

KANEENE, J. B.; MOSTOSKY, U. V.; MILLER, R. Update of a retrospective cohort study of chances in hip joint phenotype of dogs evaluated the OFA in the United State, 1989-2003. **Veterinary Surgery**, v. 38, n. 3, p. 398-405, 2009.

KAPATKIN, A. S.; FORDYCE, H. H.; MAYHEW, P. D.; SMITH, G. K. Canine Hip Dysplasia, The Disease and its Diagnosis. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 24, p. 526- 537, 2002.

KAWASHIMA, N. Characterisation of dental pulp stem cell: a new horizon for tissue regeneration? **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 11, p. 1439-1458, 2012.

KELLY, J. K.; MACALLISTER, H. **Diagnostic radiology and ultrasonography of the dog and cat**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. 512 p.

KIM, J.; KANG, H. M.; KIM, H.; KIM, M. R.; KWOH, H. C.; GYE, M. C.; KANG, S. G.; YANG, H. S.; YOU, J. Ex Vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, p. 581-594, 2007.

KINZEL, S.; HEIN, S.; SCHEVEN, V.; KUPPER, W. 10 years experience with denervation oh the hip joint capsule for the treatment of canine hip joint dysplasia and arthrosis. **Berliner Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, Berlin, v. 115, n. 1-2, p. 53-56, 2002a.

KINZEL, S.; SCHEVEN, C. V.; BUECKER, A.; STOPINSKI, T.; KUPPER, W. Clinical evaluation of denervation of the canine hip joint capsule: a retrospective study of 117 dogs. **Veterinary Comparative Orthopaedics and Traumatology**, Stuttgart, v. 15, n. 1, p. 51-56, 2002b.

KRAMPERA, M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G.; FRANCHINI, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**, v. 39, n. 4, p. 678-683, 2006.

KUO, T.; LIN, H.; YANG, K.; LIN, F.; CHEN, M.; WU, C.; CHANG, H. H. Bone marrow combined with dental bud cells promotes tooth regeneration in miniature pig model. **Artificial Organs**, v. 35, n. 2, p. 113-121, 2010.

LEPPANEN, M.; SALONIEMI, H. Controlling canine hip dysplasia in Finland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 42, n. 2, p. 121-131, 1999.

LE BLANCK, K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. **Cytotherapy**, v. 8, n. 6, p. 559-561, 2006.

LEE, K. S.; NAH, J. J.; LEE, B. C.; LEE, H. T.; LEE, H. S.; SO, B. J.; CHA, S. H. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 1, p. 144-151, 2013.

LEE, S. Y.; ANDERSON, J. W.; SCOTT, G. L.; MOSSMAN, H. W. Ultrastructure of the Placenta and Fetal Membranes of the Dog: II The Yolk Sac. **The American Journal of Anatomy**, v. 166, n. 3, p. 313-327, 1983.

LI, H.; NIEDERKORN, J. Y.; NEELAMS, S.; MATHEW, E.; WORD, R. A.; MCCULLEY, J. P.; ALIZADEH, H. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. **Investigate Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, p. 900-907, 2005.

LIMA, S. A. F.; WODEWOTZKY, T. I.; LIMA-NETO, J. F.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; ALVARENGA, F. C. L. Diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 463-469, 2012.

LUST, G.; RENDANO, V. T.; SUMMERS, B. A. Canine hip dysplasia: concepts e diagnosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 187, n. 6, p. 638-640, 1985.

LUYTEN, F. P. Mesenchymal stem cell in osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 16, n. 5, p. 599-603, 2004.

MÄKI K.; LIINAMO, A. E.; OJALA, M. Estimates of genetic parameters for hip and elbow dysplasia in finnish Rottweilers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 5, p. 1141- 1148, 2000.

MARCUS, A. J.; WODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 3, p. 730-742, 2008.

MARTINEZ, S. A. Congenital conditions that lead to osteoarthritis in the dog. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 27, n. 4, p. 735-758, 1997.

MARTINS, G. L.; TEIXEIRA, M. F.; BESERRA JUNIOR, R. Q.; DIAS, R. P.; AGUIAR, T. D. F.; MARINHO, R. C.; PINHEIRO, A. R. A. Células-tronco mesenquimais: características, cultivo e uso na Medicina Veterinária. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 2, p. 1 81-202, 2014.

MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; SELBACH, I.; SILVA, A. S. da; BRAGA, L. M.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N. B. Acupoint injection of autologous stromal vascular fraction and allogenic adipose-derived stem cells to treat hip dysplasia in dogs. **Stem Cells International**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

MATIS, U. Hip dysplasia therapy. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATIONWSAVA CONGRESS, 2000, Amsterdan. [**Proceedings...**] 2000.

MCCANLEY, L.; GLINSKY, M. H. Acupuncture. In: MILLIS, D. L.; LEVINE, D.; TAYLOR, R. A. **Canine rehabilitation & physical therapy**, USA: Saunders, 2004. p. 337-345.

MEDVINSKY, A. L.; SAMOYLINA, N. L.; MULLER, A. M.; DZIERZAK, E. A. An early pre-liver entraembryonic source of CFU-S in the developing mouse embryo. **British Journal of Hematology**, v. 18, p. 279-296, 1993.

MIAO, Z. J.; JIN, L.; CHEN, J.; ZHU, W.; HUANG, J. ZHAO, H. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comaparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology**, v. 30, p. 681-687.

MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; DOS SANTOS MARTINS, D.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LESISER, R. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1699-1702, 2006.

MIHU, C. M.; RUS CIUCA, D.; SORITAV, O.; SUSMAN, S.; MIHU, D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 50, p. 70-73, 2009.

MIKI, T.; STROM, M. C. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. **Stem Cell Reviews**, v. 2, p. 133-142, 2006.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **PNAS**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, 2003.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO-NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 559-561, 2010.

MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO-NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Terapia celular em reparação óssea – Aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. **Ciência Veterinária dos Trópicos**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2008.

MORGAN, J. P.; STEPHENS, M. **Radiographic diagnosis and control of canine hip dysplasia**. Ames: Iowa State University Press, 1985

MURPHY, J. M.; FINK, D. J.; HUNZIKER, E. B. Stem cell therapy in a caprine modelo of osteoarthritis. **Rheumatology**, v. 48, n. 12, p. 3463-3474, 2003.

NATHAN, S.; DAS DE, S.; THAMBYAH, A. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: A novel use for adipose tissue. **Tissue Engineering**, v. 9, n. 4, p. 733-744, 2003.

NOGUEIRA, S. R.; ROCHA, L. B.; TUDURY, E. A. Utilização do índice de distração no diagnóstico da displasia coxofemoral. **Clínica Veterinária**, v. 10, n. 54, p. 28-41, 2005.

OLIVEIRA, G. K.; RAISER, A. G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F. Z.; MARTINS, D. B.; DEZENGRINE, R. Células-tronco mononucleares autólogas de proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentais induzidos em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 72-79, 2010.

OLIVIA, V. N. L. S. Avaliação clínica de diferentes antiinflamatórios não esteroides na analgesia pós-operatória de cirurgias ortopédicas em cães. **Clínica Veterinária**, v. 50, p. 42-44, 2004.

OLMSTEAD, M. L. Canine cemented total hip replacements: State of the art. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 395-399, 1995.

OLMSTEAD, M. L.; HOHN, R. B.; TURNER, T. M. A five year study of 221 total hip replacements in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Schaumburg, v. 183, n. 2, p. 191-194, 1983.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: Na update. **Placenta**, v. 25, p. 5186-5195, 2011. Supplement, 2.

PERRY, B. C.; ZHOU, D.; WU, X.; YANG, F. C.; BYERS, M. A.; CHU, T. M.; HOICHEMA, J. J.; WOODS, E. J.; GOEBEL, W. S. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. **Tissue Engineering Part C**, v. 14, n. 2, p. 146-156, 2008.

PINTO FILHO, S. T. L.; TREICHEL, T. L. E.; ARAMBURÚ JUNIOR, J. S.; ROSA, M. B.; DALMOLIN, F.; BRUN, M. V.; KRAUSE, A.; PIPPI, N. L. Células-tronco mesenquimais adultas: Características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 49-59, 2013.

PLUMB'S, D. C. **Veterinary drugs handbook**. 6. ed. Iowa: Blackweel, 2008.

PORTDAR, P. D.; JETHMALANI, Y. D. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. **World Journal Stem Cells**, v. 7, n. 5, p. 839-851, 2015.

QUEIORZ, R. A.; ALMEIDA, E. L.; SILVA, M. M. S.; LIMA, E. R. Efeito das células tronco autógenas nas doenças articulares degenerativas displásicas. Estudo em cães. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10., 2010, Recife. 2010.

RAWSON, E. A.; ARONSOHN, M. G.; BURK, R. L. Simultaneous bilateral femoral head and neck ostectomy for the treatment of canine hip dysplasia. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 41, n. 3, p. 166-170, 2005.

REED, A. L.; KELLER, G. G.; VOGT, D. W.; ELLERSIECK, M. R.; CORLEY, E. A. Effect of dam and sire qualitative hip conformation scores on progeny hip conformation. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 217, p. 675- 680, 2000.

REGONATO, E.; CANOLA, J. C.; CHIERICE, G. O.; PADILHA FILHO, J. G. Avaliação radiográfica da cobertura acetabular à cabeça femoral, após osteotomia tripla e aplicação de cunha sacroilíaca, em pelve de cadáveres de cães, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 625-631, 2009.

REMEDIOS, A. M. Treatment of canine hip dysplasia. **Canadian Veterinary Journal**, v. 36, p. 503- 509, 1995.

RUSSE, I.; SINOWATZ, F.; RICHTER, L.; LEHMANN, M.; SCHALLENBERGER, E. The development of the yolk sac in ruminants (sheep and cattle). **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 21, n. 4, p. 324-347, 1992.

SCHAUWER DE, C.; SOOM, A. V. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1431-1443, 2011.

SCHMAEDECKE, A. **Estudo quantitativo das fibras nervosas do periósteo acetabular em cães**. 2004. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SCHULZ, K. S.; DEJARDIN, L. M. Surgical treatment of canine hip dysplasia. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2003. Cap. 145, p. 2029-2059.

SEO, B. M.; SONOYAMA, W.; YAMAZA, T.; COPPE, C.; KIKUIRI, T.; AKYAMA, K.; LEE, J. S.; SHI, S. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Diseases**, v. 14, n. 5, p. 428-434, 2008.

SOMMER, E. L.; FRATOCCHI, C. L. G. Displasia Coxofemoral. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 1, p. 31-35, 1998.

SOUZA, A. F. A.; TUDURY, E. A. Displasia coxofemoral: diagnóstico clínico e radiográfico – Revisão. **Clínica Veterinária**, v. 8, n. 47, p. 54-66, 2003.

SOUZA, L. M. **Caracterização de célula-tronco de polpa dentária humana obtida de dentes decíduos e permanentes**. 2008. 111 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciência da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

STEINETZ, B. G.; GOLDSMITH, L. T.; LUST, G. Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 3, p. 719-725, 1987.

STREM, B. M.; HICCK, K. C.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; SCHREIBER, R. E.; FRASER, J. K.; HEDRICK, M. H. Multipotential differentiation of adipose tissue derived stem cells. **The Keio Journal of Medicine**, v. 54, n. 3, p. 132-141, 2005.

SUMMER-SMITH, G. Hip dysplasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATIONWSAVA CONGRESS, 2000, Amsterdam. [**Proceedings...**] 2000. p. 382-383.

SWENSON, L.; AUDELL, L.; HEDHAMMAR, A. Prevalence and inheritance of and selection for hip dysplasia in seven breeds of dogs in Sweden and benefit, cost analysis of a screening and control program. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 210, p. 207- 214, 1997.

TAVIAN, M.; HALLAIS, M. F.; PEAULT, B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human-embryo. **Development**, v. 126 p. 793-803, 1999.

TEIXEIRA, A. Uso terapêutico de células-tronco, embrionárias ou não embrionárias? **Einstein**, v. 3, n. 4, p. 295-297, 2005.

THARASANIT, T.; PHUTIKANIT, N.; WANGDEE, C.; SOONTORNVIPART, K.; TANTRAJAK, S.; KAEWAMATAWONG, T. Differentiation potentials of canine bone

marrow mesenchymal stem cell. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, n. 11, p. 79-86, 2011.

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

TORRES, R. C. S.; ARAUJO, R. B.; REZENDE, C. M. F. Distrator articular no diagnóstico radiográfico precoce da displasia coxofemoral em cães, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 27-34, 2005.

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. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1113-1118, 2004.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; L'ABBATE, A.; CATACHIO, C. R.; VENTURA, M.; CREMONESI, A. C.; DELL AQUILA, M. E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation ptency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, aminion, and umbilical cord matrix. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 5, p. 361-373, 2011.

VIEIRA, G. L. T.; TÔRRES, R. C. S.; BARROS, G. S.; ROCHA, B. D.; REZENDE, C. M. F. Associação entre o ângulo de Norberg, o percentual de cobertura da cabeça femoral, o índice cortical e o ângulo de inclinação em cães com displasia coxofemoral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1094-1101, 2010.

WALACE, L. J. Canine hip dysplasia: past and present. **Seminars in Veterinary Medicine e Surgery, (Small Anim)**, v. 2, p. 92-106, 1987.

WANG, W.; ITAKA, K.; OHBA, S.; NISHIYAMA, N.; CHUNG, U.; YAMASAKI, Y.; KATAOKA, K. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 30, p. 2705-2715, 2009.

WENCESLAU, C. V. **Análise de células mesenquimais do saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos**. 2009. 198 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D.; AMBRÓSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, T. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. **Tissue Engineering Part A**, v. 17, p. 2165-2176, 2011.

WOOD, J. L.; LAKHANI, K. H. Hip dysplasia in labrador retrievers, the effects of age at scoring. **Veterinary Record**, v. 52, n. 2, p. 37- 40, 2003.

WOODS, E. J.; PERRY, B. C.; HOCKEMA, J. J.; LARSON, L.; ZHOU, D.; GOEBEL, W. S. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origem for banking and clinical use. **Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 150-157, 2009.

YEN, A. H-H.; SHARPE, P. T. Stem cells and tooth tissue engineering. **Cell Tissue Research**, v. 331, p. 359-372, 2008.

YEN, B. L.; HUANG, H. I.; CHIEN, C. C.; JUI, H. Y.; KO, B. S.; YAO, M.; SHUN, C. T.; YEN, M. L.; LEE, M. C.; CHEN, Y. C. Isolation of multipotente cells from human tern placenta. **Stem Cell**, v. 23, n. 1, p. 3-9, 2005.

YU, J.; THOMSOM, J. A. Pluripotent stem cell lines. **Genes & Development**, v. 22, n. 15, p. 1987-1997, 2008.

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

ZANJANI, E. D.; ASCEMSÃO, J. L.; TAVASSOLI, M. Liver-derived fetal hematopoietic stem cells slectively and preferentially home to the fetal bone marrow. **Blood**, v. 81, p 399-404, 1993.

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A displasia coxofemoral (DCF) é uma patologia degenerativa das articulações do quadril que causa alterações biomecânicas, distrofia muscular e muita dor.

Será estudada neste trabalho uma nova forma de tratamento para a DCF que visa à regeneração articular, com o uso de células de saco vitelino, uma célula tronco com capacidade de auto-renovação ilimitada acompanhada de alta plasticidade, permitindo que as mesmas se diferenciem em outros tipos celulares.

Haverá dois grupos de estudo, o grupo controle e o grupo de tratamento, cada um formado por seis animais com DCF bilateral.

O animal em estudo será sedado, radiografado, haverá coleta de sangue e após punção da cápsula articular será coletado líquido sinovial e posteriormente aplicação de célula de saco vitelino (grupo de tratamento) ou solução salina fisiológica (grupo controle).

Após a introdução de um cateter na veia cefálica do membro anterior, fixa por esparadrapo na pele, será coletado cerca de 2,0 ml de sangue para exame hematológico completo, posteriormente acoplada uma seringa contendo anestésico e introdução do mesmo via endovenosa a fim de se obter o relaxamento do animal e consequentemente sua sedação.

Após esse procedimento, será feita tricotomia dos pelos na região do trocânter maior, assepsia da área com álcool seguida da punção com agulha de Tuohy da cápsula articular do quadril bilateral, neste instante será realizado um exame de raio-x para detectar se a agulha se encontra dentro da cápsula articular, confirmando seu posicionamento correto será retirado cerca de 1,0ml de líquido sinovial para análise seguida de aplicação de cerca de 0,2 ml do pellet celular ou solução salina fisiológica.

Um novo exame radiográfico será feito após as aplicações para avaliação das articulações do quadril e para servir de comparação com os exames posteriores.

Após todas essas etapas concluídas, o animal será mantido em observação, até o efeito anestésico ter terminado.

A duração de todo o trabalho de uma sessão de aplicação terá em torno de 1 hora, estando o proprietário ciente deste tempo de espera.

O animal receberá por via injetável uma dose de analgésico após o término das punções, ficando por conta do proprietário a administração de analgésico por via oral a ser prescrito.

Serão realizadas três aplicações com intervalos de 30 dias e a mesma sistemática será mantida em todas as sessões.

Após trinta dias da última aplicação o animal retornará para o último acompanhamento radiográfico, hematológico e do líquido sinovial, não será realizado aplicação nesta sessão.

O tempo total de duração do trabalho será de 90 dias, com avaliações mensais dos animais.

O proprietário receberá em cada avaliação uma ficha de avaliação do seu animal, onde terá que responder algumas questões sobre a evolução do mesmo durante o tratamento.

O animal em questão não pode ter doenças prévias que comprometam o resultado e bom andamento do trabalho.

Vale ressaltar que um procedimento anestésico por mais seguro que seja não está totalmente isento de risco de óbito do paciente.

Trata-se de um estudo experimental em que se bem sucedido pode levar a uma melhora clínica significativa ao paciente tratado com pellet celular, levando a uma melhora de qualidade de vida sem um procedimento cirúrgico invasivo e com maiores riscos do que o aqui proposto.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de tratamento do animal.

Direito de confidencialidade – As informações obtidas (relativas tanto ao proprietário quanto ao animal) serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum animal ou proprietário.

Todo o procedimento descrito será realizado no Centro de Medicina Veterinária Diagnóstica (CMVD), situada na R: Uruguai, nº 35, Vila Castelo Branco, Indaiatuba-SP, tel.: (19) 3312-0512.

Não haverá custo para o proprietário dos procedimentos aqui descritos.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Daniel Tonin Benedetti que pode ser encontrado pelo telefone (19) 78078547 e-mail: dtbvet@yahoo.com.br.

O pesquisador firma aqui o compromisso de só utilizar os dados e resultados obtidos para a presente pesquisa.

Todas essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste projeto de pesquisa que visa o tratamento da DCF com aplicações de células de saco vitelino, em um procedimento simples, pouco invasivo, que tem por finalidade avaliar o potencial das células-tronco em doenças articulares e sua contribuição nas lesões articulares já existentes.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação do potencial das células de saco vitelino canino para uso terapêutico em cães com displasia coxofemoral”.

Eu discuti com o Dr. Daniel Tonin Benedetti sobre a minha decisão em incluir meu(s) animal(is) nesse estudo.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados em meu(s) animal(is), seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Concordo voluntariamente que meu(s) animal(is) participe(m) deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu ou meu(s) animal(is) possa(m) ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome e assinatura do proprietário ou responsável
(caso seja o responsável, descrever o vínculo)

Data
____/____/____

Nome e assinatura da testemunha

Data
____/____/____

Para casos de proprietários analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste proprietário para a participação de seu(s) animal(is) neste estudo.

Nome e assinatura do responsável pelo estudo

Data
____/____/____