ROSANE MARIA GUIMARÃES DA SILVA

**Estudo morfométrico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico
do ligamento cruzado cranial com ruptura em cães**

São Paulo

2007

ROSANE MARIA GUIMARÃES DA SILVA

**Estudo morfométrico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico
do ligamento cruzado cranial com ruptura em cães**

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Julia Maria Matera

São Paulo

2007

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.1906
FMVZ

Silva, Rosane Maria Guimarães da
Estudo morfométrico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico do ligamento cruzado cranial com ruptura em cães / Rosane Maria Guimarães da Silva.
– São Paulo: R. M. G. Silva, 2007.
126 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Julia Maria Matera.

1. Ligamento cruzado cranial. 2. Ruptura do ligamento. 3. Cães.
4. Histopatologia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo histológico, ultra estrutural e imunohistoquímico do ligamento cruzado cranial em cães", protocolo nº730/2005, utilizando 20 cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Júlia Maria Matera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Histologic, ultra structural and immunohistochemical study of the canine cranial cruciate ligament", protocol number 730/2005, utilizing 20 dogs, under the responsibility of Prof. Dr. Júlia Maria Matera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 19 de agosto de 2005

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Rosane Maria Guimarães da

Título: Estudo morfométrico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico do ligamento cruzado cranial com ruptura em cães

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu marido **Augusto** que está sempre comigo. Obrigada pelo seu amor.

Ao meu filho **Daniel** que me faz a pessoa mais feliz do mundo.

A vocês dois, que são a razão para comemorar cada conquista na minha vida, quero dedicar este trabalho, agradecer a paciência e pedir desculpas pelos momentos em que não estive presente.

Eu amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais **Antonio** e **Eliane**, que durante toda a minha vida me apoiaram e me ajudaram para que eu pudesse concluir com êxito os meus estudos.

Ao meu irmão **Luis Antonio**, meu grande amigo sempre.

Às minhas avós **Rosa** e **Oldemarina** que sempre me incentivaram. Obrigada pelo carinho e pelas orações.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profa. Dra. Julia Maria Matera**, quero agradecer por confiar em mim mais uma vez. Tenho muito orgulho em tê-la como orientadora, amiga e exemplo de educadora.

À **Profa. Dra. Elia Garcia Caldini**, agradeço pela colaboração imprescindível para a realização deste trabalho.

À minha amiga **Mariana Matera Veras**, agradeço o apoio durante todas as etapas deste trabalho, o carinho e a amizade.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, que me recebeu neste programa de pós-graduação, meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Angelica Cecilia Tatarunas, agradeço a atenção e a colaboração para a realização deste trabalho.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres agradeço pelos ensinamentos e pelo apoio.

À médica veterinária Luciana Neves Torres agradeço a colaboração na coleta de material para este trabalho.

Aos funcionários Alessandra A. Araújo Souza, Belarmino Ney Pereira, Diogo Nader Palermo, Ednaldo Ribas Faria, Jaqueline Martins de Santana, José Miron Oliveira da Silva, Maicon Barbosa da Silva, Ronaldo Agostinho da Silva e Sandra Freiburger agradeço a ajuda recebida durante todo este curso de pós-graduação.

A todos os funcionários do HOVET meus sinceros agradecimentos.

Às amigas Nilsa Regina Damaceno Rodrigues e Maria Iris Amorim agradeço toda a colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários do LIM 59 da FMUSP, o meu muito obrigada pela ajuda.

Aos meus colegas de pós-graduação agradeço a ajuda que tive durante todo o tempo de desenvolvimento deste trabalho e quero dizer que sou muito feliz por ter convivido com vocês.

Às funcionárias da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia agradeço o auxílio e atenção.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-graduação agradeço a atenção recebida durante todo este trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Amaku e ao colega Valdecir Marvulle pelo auxílio com a análise estatística.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

À CAPES pelo apoio financeiro que tornou viável o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Deus pela presença em todos os momentos da minha vida.

“O amor para ser perfeito não deve ter por alvo exclusivamente a humanidade mas, também, os animais. Só assim, então, pode chamar-se: amor perfeito.”

Francisco Mondino, 1939

RESUMO

SILVA, R. M. G. da. **Estudo morfométrico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico do ligamento cruzado cranial com ruptura em cães.** [Morphometric, ultrastructural and immunohistochemical study of ruptured cranial cruciate ligament in dogs]. 2007. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A ruptura total ou parcial do ligamento cruzado cranial (LCCr), é considerada uma das principais causas de instabilidade no cão e está entre as mais freqüentes afecções ortopédicas no cão. A ruptura do ligamento cruzado cranial (RLCCr) implica em tratamento cirúrgico por artroscopia ou artrotomia e se faz necessária a retirada dos seus resquícios e a sua substituição. Trinta e oito amostras de LCCr rompidos de animais submetidos ao tratamento cirúrgico para RLCCr e 13 amostras de LCCr íntegro de cadáveres de cães que tenham vindo a óbito por diferentes causas e sem histórico de doença articular foram coletadas para a realização de um estudo morfométrico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico das células e componentes da matriz extracelular presentes no LCCr desses cães. Os cortes histológicos foram corados pela Hematoxilina-Eosina para análise histopatológica, Picrossirius-Hematoxilina para análise do colágeno, Resorcina- Fucsina para estudo das fibras do sistema elástico e Alcian-Blue-PAS para proteoglicanas. Os resultados sugeriram que houve diferença significativa entre os LCCr rompidos do grupo dos Labradores e as amostras íntegras do grupo controle no que diz respeito às alterações celulares. Em relação ao estudo de fibras colágenas a área ocupada foi significativamente maior no grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação às fibras do sistema elástico, entretanto, houve correlação entre a densidade linear destas fibras com a idade dos animais. Também foi possível estabelecer uma correlação entre peso e idade e, entre peso e tempo de evolução da doença articular. No estudo imuno-histoquímico para α -actina de músculo liso e Caspase 3, o grupo cirúrgico apresentou maior número de marcações positivas que o grupo controle.

Palavras-chave: Ligamento cruzado cranial. Ruptura do ligamento. Cães.
Histopatologia.

ABSTRACT

SILVA, R. M. G. da. **Morphometric, ultrastructural and immunohistochemical study of ruptured cranial cruciate ligament in dogs.** [Estudo morfométrico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico do ligamento cruzado cranial com ruptura em cães]. 2007. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Total or partial rupture of the cranial cruciate ligament (CCL) is one of the main causes of instability on dogs and is one of the most frequent orthopedic conditions of the dog. The rupture of CCL demands surgical procedure by arthroscopy or arthrotomy and the extraction and replacement of its remaining fragments is needed. Thirty-eight samples of ruptured CCL, collected during the surgical time and thirteen samples of intact CCL collected from cadavers of dogs without articular disease history were examined in this study. Morphometric, ultrastructural and immunohistochemical techniques were realized to study cells and extracellular matrix of CCL samples. The tissue sections were stained by Hematoxilyn-Eosin to histopathological study, Picrosirius-Hematoxilyn to collagen study, Resorcin-Fucsin to elastic fibers study and Alcian Blue-PAS to proteoglicans study. The results suggest that there were significant differences between the ligaments of the Labrador retrievers and the intact ligaments of the control group regarding the cellular changes. The control group had a significant larger area occupied by collagen fibers than the other groups. There is no statistical difference on elastic fibers among the groups. However the linear density of elastic system fibers could be correlated with age of dogs. There was a correlation between weight and age, and between weight and time of development of articular disease. Immunohistochemical study showed more positive cells to α -smooth muscle actin and caspase-3 in the ruptured CCL than the control group.

Key words: Cranial cruciate ligament. Rupture of ligament. Dogs. Histopathology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Cão Nº 43. Fotomicrografia do LCCr íntegro em corte longitudinal; Hematoxilina- fucsina-azul de toluidina. A- Observar a alinhamento regular e ordenado dos feixes de fibras de colágeno (*). B- Os fibroblastos apresentam núcleo alongado e dispõem-se em fileiras paralelas aos feixes (seta); um delicado tecido conjuntivo frouxo (*) separa os feixes de fibras..... 73
- Figura 2- Cão Nº 43. Fotomicrografia do LCCr íntegro em corte transversal, Hematoxilina-fucsina- azul de toluidina. A- Observar a organização das fibras de colágeno em feixes(----) e fascículos (----). B- observar a localização dos fibroblastos perifericamente aos feixes (seta)..... 73
- Figura 3- Cão Nº 43. Fotomicrografia do LCCr íntegro em corte longitudinal; Picrossírius-hematoxilina. A- Observar a organização das fibras de colágeno em feixes paralelos (*) e sua aparência ondulada (*crimp*) (-- -). B- Em maior aumento, observar a localização dos fibroblastos perifericamente aos feixes (seta) e com seus núcleos paralelos as fibras..... 74
- Figura 4- Cão Nº 44. Fotomicrografia do LCCr íntegro em corte longitudinal, RFO. A- Observar a pequena quantidade de fibras do sistema elástico (seta) entremeadas entre os feixes de fibras de colágeno dispostas paralelamente a eles. B- Observar no tecido conjuntivo entre os feixes de fibras de colágeno, que as fibras do sistema elástico são mais numerosas e espessas e com disposição irregular (setas brancas)..... 75
- Figura 5- A- Cão Nº 34; B- Cão Nº 1. Fotomicrografia do LCCr rompido em corte longitudinal, RFO. A e B- observar a perda do alinhamento paralelo das fibras do sistema elástico (seta) com relação as fibras de colágeno(*)..... 76
- Figura 6- Fotomicrografias de LCCr rompidos classificados em Grau I. A- Cão Nº 22. Corte transversal observar a perda da organização dos feixes de fibras de colágeno e a presença de fibroblastos arredondados (seta), HE; B- Cão Nº 35. Observar área de alteração do tecido ligamentar (*) e a manutenção do *crimp* (seta), PSH..... 77

Figura 7-	Cão Nº 19. Fotomicrografias de LCCr rompidos classificados em Grau II. A- Corte longitudinal - observar a perda da organização da matriz colágena em feixes de fibras; aumento na densidade de fibroblastos, HE; B- Observar a perda de alinhamento dos fibroblastos e sua aparência mais arredondada e áreas de metaplasia condróide (seta), PSH.....	78
Figura 8-	Fotomicrografias de LCCr rompidos classificados em Grau III. A- Cão Nº 11. Observar a perda da matriz colágena e da organização das fibras em feixes longitudinais paralelos, áreas de metaplasia condróide, HE. B- Cão Nº 20. Ilhas de mineralização (*); Resorcina-fucsina- azul de toluidina;. C- Cão Nº 20. Observar a desorganização da matriz, PSH.....	79
Figura 9-	Fotomicrografia do LCCr em corte longitudinal;A- Cão Nº 40. No LCCr íntegro as proteoglicanas coradas em azul concentram-se principalmente entre os feixes de colágeno (*); B- Cão Nº 25. Os LCCr rompidos mostraram-se fortemente corados em azul, especialmente nas regiões pericelulares (seta). AB-PAS; 20X.....	89
Figura 10-	Cão Nº 53. Fotomicrografia eletrônica de LCCr íntegro. A- Fibroblasto (F) entre feixes de colágeno em cortes transversais (*) e longitudinais (**); B e C- Porção de um fibroblasto evidenciando citoplasma rico em RER (seta azul) e vesículas (seta branca), fibrilas de colágeno exibindo faixas claras e escuras alternadamente (detalhe). D- MEC evidenciando fibrilas de colágeno de diferentes diâmetros organizadas em feixes, fibras do sistema elástico (*).....	92
Figura 11-	Fotomicrografia eletrônica de LCCr rompido. A-Cão Nº 10. Ffibroblasto alongado (F); B-Cão Nº 10. Célula semelhante a condrócito, com núcleo (N) excêntrico. A MEC apresenta-se desorganizada e observam-se fibrilas de colágeno de diferentes diâmetros dentro de um mesmo feixe (A- detalhe); C e D- Cão Nº 17. A região pericelular mostra fibrilas de colágeno desorganizadas e de tamanhos diferentes (setas) e apresenta uma região com características de colágeno tipo II (*).....	94
Figura 12-	Fotomicrografia do LCCr com marcação positiva para α -actina de músculo liso (setas). A- Cão nº 51, LCCr íntegro em corte longitudinal; B- Cão nº 18, LCCr rompido em corte longitudinal.....	95
Figura 13-	Fotomicrografia do LCCr com marcação positiva para Caspase-3 (setas). A- Cão nº 50, LCCr íntegro em corte longitudinal; B- Cão nº 10, LCCr rompido em corte longitudinal.....	98

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Distribuição das raças do grupo cirúrgico das amostras de LCCr - São Paulo - 2007.....	67
Gráfico 2-	Distribuição dos animais do grupo cirúrgico em relação à idade - São Paulo - 2007.....	69
Gráfico 3-	Distribuição dos animais (grupos cirúrgico e controle) quanto ao peso corpóreo - São Paulo - 2007.....	70
Gráfico 4-	Proporção entre machos e fêmeas em cada grupo - São Paulo - 2007	70
Gráfico 5-	Proporção de articulação acometida (joelho direito e joelho esquerdo) em cada grupo - São Paulo - 2007.....	71
Gráfico 6-	Distribuição dos animais do grupo cirúrgico quanto ao tempo de evolução da lesão - São Paulo - 2007.....	72
Gráfico 7-	Comparação da média de fração de área ocupada por metaplasia condróide (%) no tecido ligamentar entre os grupos de estudo - São Paulo - 2007.....	82
Gráfico 8-	Análise estatística da fração de área ocupada por metaplasia condróide entre os grupos - São Paulo - 2007.....	83
Gráfico 9-	Comparação da fração de área ocupada por fibras de colágeno no tecido ligamentar (%) entre os grupos de estudo - São Paulo - 2007...	84
Gráfico 10-	Análise estatística da área ocupada por fibras de colágeno entre os grupos - São Paulo - 2007.....	86
Gráfico 11-	Comparação da densidade linear de fibras do sistema elástico no tecido ligamentar entre os grupos de estudo - São Paulo - 2007.....	87
Gráfico 12-	Análise estatística de densidade linear de fibras do sistema elástico - São Paulo - 2007.....	88
Gráfico 13-	Comparação da fração de área ocupada por proteoglicanas no tecido ligamentar entre os grupos de estudo - São Paulo - 2007.....	90
Gráfico 14-	Análise estatística da fração de área ocupada por proteoglicanas - São Paulo - 2007.....	91
Gráfico 15-	Comparação entre os grupos da média da área (μm^2) necessária para identificação de uma célula marcada por α - actina de músculo liso - São Paulo - 2007.....	96

Gráfico 16-	Análise estatística da média da área necessária para identificação de uma célula marcada por α -actina de músculo liso - São Paulo- 2007..	97
Gráfico 17-	Comparação entre os grupos da média da área (μm^2) necessária para identificação de uma célula marcada por α - actina de músculo liso - São Paulo - 2007.....	99
Gráfico 18-	Análise estatística da média da área necessária para identificação de uma célula marcada por Caspase 3 - São Paulo - 2007.....	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Descrição dos animais do grupo cirúrgico - São Paulo - 2007.....	66
Quadro 2-	Descrição dos animais do grupo controle - São Paulo - 2007.....	68
Quadro 3-	Distribuição dos animais do grupo cirúrgico em graus de degeneração do LCCr - São Paulo - 2007.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição dos animais com diagnóstico de RLCCr atendidos no HOVET/FMVZ/USP entre 2004 e 2006 - São Paulo - 2007.....	62
Tabela 2-	Níveis de significância da análise comparativa da frequência de RLCCr entre raças, considerando os atendimentos entre 2004 e 2006 no HOVET/FMVZ/USP - São Paulo - 2007.....	64
Tabela 3-	Fração de área ocupada por metaplasia condróide (médias por grupos)-São Paulo - 2007.....	81
Tabela 4-	Médias da fração de área ocupada por fibras de colágeno entre os grupos - São Paulo - 2007.....	84
Tabela 5-	Descrição dos valores de p resultantes da comparação entre o grupo controle e os demais quanto à fração de área ocupada por fibras de colágeno - São Paulo - 2007.....	85
Tabela 6-	Média da densidade linear das fibras do sistema elástico nos grupos- São Paulo - 2007.....	86
Tabela 7-	Médias da fração de área ocupada por proteoglicanas - São Paulo- 2007.....	89
Tabela 8-	Distribuição das médias de área necessária para observação de 1 célula marcada para α -actina de músculo liso - São Paulo - 2007.....	96
Tabela 9-	Distribuição da média de área necessária para observação de 1 célula marcada para Caspase 3 ativada - São Paulo - 2007.....	99
Tabela 10-	Valores correspondentes à fração de área ocupada por metaplasia condróide nos fragmentos de LCCr - São Paulo - 2007.....	121
Tabela 11-	Fração de área ocupada por fibras colágenas nos fragmentos de LCCr - São Paulo - 2007.....	122
Tabela 12-	Valores correspondentes à densidade linear de fibras do sistema elástico nos fragmentos de LCCr - São Paulo- 2007.....	123
Tabela 13-	Valores correspondentes à fração de área ocupada por proteoglicanas nos fragmentos de LCCr - São Paulo -2007.....	124
Tabela 14-	Valores correspondentes área necessária para a identificação de uma célula marcada para α -actina de músculo liso nos fragmentos de LCCr - São Paulo - 2007.....	125

Tabela 15- Valores correspondentes à área necessária para a identificação de uma célula marcada para Caspase 3 nos fragmentos de LCCr - São Paulo - 2007.....	126
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

μm^2 - micrômetro quadrado

AB- alcian blue

AB-PAS- alcian blue; Ácido Periódico + Reativo de Schiff

CN- caso novo

D- direito

E- esquerdo

F- fêmea

FC- fêmea castrada

FM/USP- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FMVZ/USP- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

HE- hematoxilina-eosina

HOVET- Hospital Veterinário

IC- intervenção cirúrgica

Kg- quilograma

LCCd- ligamento cruzado caudal

LCCr- ligamento cruzado cranial

M- macho

MEC- matriz extracelular

MM- menisco medial

MS- membrana sinovial

MV- macho vasectomizado

NC- não consta no prontuário

NIH- National Institute of Health

OA-osteoartrose

PAS- Ácido Periódico + Reativo de Schiff

PSH- pricrossírius-hematoxilina

R- retorno

RFO- resorcina-fucsina com oxidação

RLCCr- Ruptura do ligamento cruzado cranial

SMA- smooth muscle actin (actina de músculo liso)

SRD- sem raça definida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	OBJETIVOS.....	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	IMPORTÂNCIA CLÍNICO-CIRÚRGICA DA RUPTURA DO LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL.....	29
2.2	ASPECTOS MACROSCÓPICOS DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO E LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL.....	30
2.3	ASPECTOS MICROSCÓPICOS DO LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL.....	32
2.3.1	Células.....	34
2.3.2	Colágeno.....	35
2.3.3	Fibras do sistema elástico.....	37
2.3.4	Proteoglicanas.....	39
2.4	ALTERAÇÕES TECIDUAIS OCORRIDAS NA RUPTURA DO LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1	COLETA DO MATERIAL.....	46
3.2	GRUPOS.....	47
3.2.1	Grupo cirúrgico.....	47
3.2.2	Grupo controle.....	48
3.3	PROCESSAMENTO DO MATERIAL.....	48
3.3.1	Microscopia de luz.....	48
3.3.1.1	<i>Hematoxilina-Eosina.....</i>	<i>49</i>
3.3.1.2	<i>Picrossírius-Hematoxilina.....</i>	<i>49</i>
3.3.1.3	<i>Resorcina Fucsina com oxidação.....</i>	<i>50</i>

3.3.1.4	<i>Alcian Blue-PAS</i>	50
3.3.1.5	<i>Resina</i>	50
3.3.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	52
3.3.3	Imuno-histoquímica.....	53
3.3.3.1	<i>α-actina de músculo liso</i>	54
3.3.3.2	<i>Caspase-3</i>	54
3.4	METODOLOGIA PARA ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	54
3.4.1	Análise dos dados epidemiológicos dos casos do HOVET.....	54
3.4.2	Análise do material coletado.....	55
3.4.2.1	<i>Análise histopatológica</i>	55
3.4.2.2	<i>Análise do colágeno</i>	56
3.4.2.3	<i>Análise das fibras do sistema elástico</i>	57
3.4.2.4	<i>Análise de proteoglicanas</i>	57
3.4.2.5	<i>Análise pela microscopia eletrônica de transmissão</i>	58
3.4.2.6	<i>Análise do material submetido ao estudo imuno-histoquímico</i>	58
3.4.3	Análise estatística.....	59
4	RESULTADOS	61
4.1	ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS RAÇAS PREDISPOSTAS À RUPTURA DO LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL.....	61
4.2	DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS ESTUDADOS.....	64
4.2.1	Grupo cirúrgico.....	65
4.2.2	Grupo controle.....	67
4.2.3	Análise estatística dos grupos.....	68
4.3	ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	72
4.3.1	Grupo controle.....	72

4.3.2	Grupo cirúrgico.....	75
4.3.2.1	<i>Classificação do Ligamento cruzado cranial em graus de degeneração.....</i>	77
4.4	ESTUDO MORFOMÉTRICO.....	80
4.4.1	Estudo morfométrico da fração de área ocupada por metaplasia condróide.....	80
4.4.1.1	<i>Análise estatística.....</i>	82
4.4.2	Estudo morfométrico das fibras de colágeno.....	83
4.4.2.1	<i>Análise estatística.....</i>	84
4.4.3	Estudo das fibras do sistema elástico.....	86
4.4.3.1	<i>Análise estatística.....</i>	87
4.4.4	Estudo de proteoglicanas.....	88
4.4.4.1	<i>Análise estatística.....</i>	90
4.5	ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL.....	91
4.6	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	95
4.6.1	Análise da imuno-histoquímica para α -actina de músculo liso.....	95
4.6.1.1	<i>Análise estatística.....</i>	97
4.6.2	Análise da imuno-histoquímica para Caspase-3.....	98
4.6.2.1	<i>Análise estatística.....</i>	100
5	DISCUSSÃO.....	102
6	CONCLUSÕES.....	113
	REFERÊNCIAS.....	115
	APÊNDICES.....	120

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A ruptura total ou parcial do ligamento cruzado cranial (LCCr) é uma das afecções mais freqüentes que acomete a articulação do joelho do cão. Para diagnóstico e tratamento dessas lesões são realizados procedimentos cirúrgicos como: artroscopia e/ou artrotomia. Essa afecção é descrita na literatura como uma das principais causas de claudicação e instabilidade articular no cão, levando à osteoartrose (OA).

Muitos trabalhos vêm sendo realizados no sentido de aprimorar as técnicas cirúrgicas para o tratamento destas lesões. Entre estes trabalhos estão os estudos das características macroscópicas e microscópicas do LCCr. A literatura chama atenção para a ruptura do ligamento cruzado cranial (RLCCr) como consequência de um processo degenerativo, mas não é conclusiva quanto às causas que levam a essa degeneração além de salientar a necessidade de novos estudos para promover um diagnóstico precoce.

Analizando a literatura disponível encontra-se estudos relativos ao LCCr normal ou rompido que enfocam separadamente diversos aspectos importantes para a compreensão da estrutura do ligamento e das possíveis alterações que levam a sua ruptura. Há poucas informações a respeito das fibras do sistema elástico no LCCr do cão e com relação à distribuição e identificação das proteoglicanas presentes no LCCr do cão.

De acordo com os dados epidemiológicos obtidos na literatura consultada e com o levantamento dos casos atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), os cães com RLCCr pertencem às raças de grande e pequeno porte, e algumas delas são consideradas predispostas à ruptura espontânea do LCCr.

Este trabalho propôs um estudo morfométrico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico das células e componentes da matriz extracelular presentes no LCCr com ruptura coletados durante a realização dos procedimentos cirúrgicos realizados no referido Serviço, traçando parâmetros comparativos entre os grupos de estudo e correlacionando com o histórico desses animais.

1.1 OBJETIVOS

♦ Caracterizar as populações celulares e os componentes da matriz extracelular (fibras e proteoglicanas) do LCCr de cães comparando o LCCr rompido com o íntegro.

♦ Relacionar as características encontradas no LCCr com as informações referentes à idade, peso, raça, sexo e histórico clínico do animal.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

As informações encontradas na literatura consultada encontram-se divididas como se segue:

2.1 IMPORTÂNCIA CLÍNICO-CIRÚRGICA DA RUPTURA DO LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL

A RLCCr seguida de desenvolvimento de osteoartrite é uma das doenças ortopédicas mais freqüentes no cão (VASSEUR et al., 1985; HARASEN, 2003; HAYASHI et al., 2003).

A patogênese da RLCCr não é claramente explicada por uma teoria, causa ou evento em particular, mas múltiplos fatores podem levar à RLCCr seguida do desenvolvimento de osteoartrite (JOHNSON; JOHNSON, 1993).

Dados epidemiológicos da ocorrência de RLCCr em cães apontam para a predisposição de raças como Mastiff, Akita, São Bernardo, Rottweiler, Labrador, American Staffordshire Terrier, Boxer, Poodle, Husky Siberiano, Newfoundlands (SCAVELLI et al., 1990; WHITEHAIR; WILLITS; VASSEUR, 1993).

Os cães das raças Rottweiler e Labrador são citados como os mais freqüentemente acometidos pela RLCCr (HARASEN, 2003) e os que mais freqüentemente são submetidos ao tratamento cirúrgico por artroscopia e/ou artrotomia desta afecção na FMVZ/USP (TATARUNAS, 2004).

Nas referências epidemiológicas há uma variação em relação à idade em que a RLCCr ocorre mais freqüentemente. Whitehair, Willits e Vasseur (1993) relatam que a ocorrência de RLCCr aumenta nos animais mais idosos, entre 7 e 10 anos de idade e, traçam uma relação com o peso corpóreo citando que nos animais com menos de 22 Kg a ruptura ocorre numa idade mais jovem.

Scavelli et al. (1990) relataram a ocorrência de RLCCr entre 1, 5 e 10 anos de idade, enquanto DUVAL et al. (1999) descreveram o problema em cães com menos

de 2 anos de idade e TATARUNAS (2004) apontou a ocorrência da lesão em cães de 8 meses até 13 anos de idade.

A RLCCr no cão é citada como uma injúria que priva o paciente, e ela nem sempre é causada por trauma. Mais freqüentemente ela é espontânea e associada a mudanças degenerativas crônicas no ligamento (WHITEHAIR; WILLITS; VASSEUR, 1993).

A progressão da osteoartrite é freqüente após tratamento médico e cirúrgico e, muitos cães têm claudicação persistente após a ruptura do LCCr, mesmo com o tratamento cirúrgico (HAYASHI et al., 2003).

Tem sido mostrado que as propriedades biomecânicas e a composição bioquímica nos ligamentos do joelho se alteram em resposta aos tipos de estresse externo e movimentação da articulação (NEWTON et al., 1990).

Campbell (1936) relatou que a ocorrência freqüente de rupturas nos ligamentos do joelho e os problemas nos tratamentos envolvidos estimulam numerosas investigações para estudar a relação entre a função e a estrutura dos ligamentos e tendões e os métodos de substituição cirúrgica.

2.2 ASPECTOS MACROSCÓPICOS DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO E LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL

A articulação do joelho é uma complexa articulação em dobradiça com duas articulações funcionalmente distintas. A sustentação do peso ocorre principalmente através da articulação entre os côndilos femoral e tibial. A articulação femoropatelar aumenta extremamente a eficiência mecânica do grupo muscular quadríceps e facilita a função dos extensores.

A cápsula articular é estruturalmente reforçada por um retináculo fibroso e por tendões e ligamentos que atravessam a articulação (VASSEUR, 1993). Os ligamentos são fortes cintas ou membranas que unem os ossos entre si (GETTY, 1986; DYCE et al., 1990). A principal sustentação ligamentar da articulação do joelho é proporcionada pelos ligamentos femorotibiais, os quais são os ligamentos colaterais medial e lateral, e os ligamentos cruzados cranial e caudal (DYCE et al.,

1990; VASSEUR, 1993). Os ligamentos cruzados cranial e caudal recebem esta denominação em função dos seus respectivos locais de inserção à tíbia. O principal aporte sangüíneo aos ligamentos cruzados origina-se dos tecidos sinoviais que embainham os ligamentos, e não de fontes originárias nos locais de inserção óssea. O corpo adiposo infrapatelar e os tecidos moles caudais à articulação são importantes fontes de vasos. O núcleo central da porção média de cada ligamento é menos vascularizado. O ligamento cruzado caudal (LCCd) origina-se no interior da fossa intercondilóide, desde a porção lateral do côndilo femoral medial, estendendo-se caudo-distal até a borda lateral da incisura poplíteia da tíbia. Este ligamento está separado em dois componentes funcionais. A parte cranial relativamente maior fica tensa em flexão e frouxa em extensão, a porção caudal fica tensa em extensão e frouxa em flexão. O LCCd impede a translação caudal da tíbia, com relação ao fêmur (movimento de gaveta caudal) e ajuda a limitar a rotação interna da tíbia, ao torcer-se junto com o LCCr. O LCCd constitui-se numa contenção secundária à hiper-extensão, ajudando a mobilização varus/valgus na articulação flexionada. O LCCr origina-se no interior da fossa intercondilóide, desde a parte caudo-medial do côndilo lateral do fêmur, estendendo-se diagonalmente através da fossa intercondilóide até a área intercondilóide cranial da tíbia. O LCCr também foi dividido em dois componentes funcionais, uma faixa crânio-medial, e uma parte caudo-lateral maior. Foram relatadas diferenças nas propriedades mecânicas de cada subunidade, e a faixa crânio-medial proporciona a maior parte da resistência ao movimento de gaveta cranial em 30° a 60° de flexão. A faixa crânio-medial fica tensa durante toda a amplitude de movimentos, e a parte caudo-lateral fica tensa em extensão, mas frouxa em flexão. Estes conceitos gerais são importantes no diagnóstico das rupturas parciais do LCCr, mas simplificam excessivamente a estrutura complexa e relações funcionais do ligamento. O LCCr se compõe de numerosos feixes de fibras de colágeno agrupados em fascículos de diâmetros diversos. Os fascículos são visíveis macroscopicamente, e em geral estendem-se desde a origem até a inserção sem cruzamentos e entrelaçamentos. O ligamento é torcido lateralmente por cerca de 90° entre os pontos de inserção. Esta torção no LCCr resulta num aspecto macroscópico de duas bandas razoavelmente distintas, especialmente em flexão. Se o ligamento é destorcido, a estrutura passa a assumir aspecto mais uniforme. Durante a mobilização da articulação, ocorre retesamento de

certos fascículos e o relaxamento de outros, o que mantém constantemente a estabilidade da articulação durante toda a amplitude de seu movimento. O LCCr é a estrutura principal de contenção contra o movimento de gaveta cranial e a hiperextensão. Ele também limita a rotação interna da tíbia ao torcer-se contra o LCCd. O LCCr impede o excessivo movimento varus ou valgus da tíbia, na flexão da articulação do joelho (VASSEUR, 1993).

O LCCr cursa de proximal para distal, os fascículos craniais mediais são rotacionados para fora em espiral, e em flexão estes fascículos se dobram em volta dos fascículos caudo-laterais (HEFFRON; CAMPBELL, 1978).

A faixa latero-caudal forma a maior parte do LCCr. O LCCr tem uma região central, que compõe seu maior eixo, e uma região epiligamentar composta da membrana sinovial e tecido conjuntivo frouxo subjacente. Os últimos tecidos cobrem o ligamento exceto onde o LCCr enrola-se em volta do LCCd (VASSEUR et al., 1985; HAYASHI et al., 2003).

2.3 ASPECTOS MICROSCÓPICOS DO LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL

Os tendões e ligamentos são formados por tecido conjuntivo. O principal elemento do tecido conjuntivo é a matriz extracelular constituída por diferentes combinações de proteínas fibrosas e de substância fundamental. A substância fundamental é um complexo viscoso e altamente hidrofílico de macromoléculas aniônicas (glicosaminoglicanas e proteoglicanas) e glicoproteínas multiadesivas (laminina, fibronectina, entre outras) que se ligam a proteínas receptoras (integrinas) presentes na superfície de células bem como aos componentes fibrilares da matriz.

Os fibroblastos sintetizam as proteínas colágeno e elastina, além de glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que fazem parte da matriz extracelular. Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e são capazes de modular sua capacidade metabólica, a qual vai se refletir na sua morfologia. As células com intensa atividade de síntese são denominadas de fibroblastos, enquanto as células metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos.

Nos colágenos tipo I, II e III as moléculas de tropocolágeno se agregam em subunidades (microfibrilas) que se juntam para formar fibrilas. As pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas são importantes para a união destas moléculas. Nos colágenos do tipo I e III, as fibrilas se associam para formar fibras (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Quando comparados tendões e ligamentos são estruturalmente similares, mas não idênticos. Os ligamentos são metabolicamente mais ativos do que os tendões possuem maior celularidade, verificada pela concentração de DNA, mais colágeno tipo III e total, e mais glicosaminoglicanas (AMIEL et al., 1984).

O tecido conjuntivo denso, que forma tendões e ligamentos, é adaptado para oferecer resistência. É caracterizado por apresentar menos células que o tecido conjuntivo frouxo e uma clara predominância de fibras colágenas orientadas segundo a direção da força, dando origem a tecido conjuntivo denso modelado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O LCCr provavelmente consiste de um fascículo contínuo de colágeno que é funcionalmente complexo, com múltiplas porções que experimentam diferentes tensões e distribuição de carga durante a locomoção (HAYASHI et al., 2004).

As fibras colágenas dentro dos fascículos do LCCr são compostas principalmente de colágeno tipo I e uma quantidade menor de colágeno tipo III (AMIEL et al., 1984).

As fibras colágenas do LCCr normal apresentam *crimps*, que correspondem a ondulações ao longo de sua extensão (HAYASHI et al., 2003).

Durante a carga de tensão das fibras colágenas do ligamento, o *crimp* é perdido antes da ruptura da fibra. *Crimp* é uma característica estrutural distinta das fibras colágenas organizadas no tecido conjuntivo denso e é uma determinante importante das propriedades biomecânicas do tecido (HAYASHI et al., 2004).

O comportamento dinâmico que os tendões e ligamentos apresentam, sugere que as suas células são capazes de, detectando mudanças na carga e coordenando sua resposta, alterar a composição da matriz extracelular. Uma das maneiras em que a MEC dos tendões e ligamentos é modificada em resposta a carga, é pela formação de matriz fibrocartilaginosa nos locais onde o tendão ou ligamento está sob compressão (BENJAMIN; RALPHS, 1998).

Os ligamentos cruzados cranial e caudal são recobertos por uma prega de membrana sinovial a qual divide incompletamente a articulação do joelho num plano sagital. Este tecido sinovial continua sobre os cornos do menisco. Este envelopamento epiligamentoso de membrana consiste principalmente de tecido conjuntivo denso, pequenos fibroblastos e alguns adipócitos na camada íntima e na fina camada sub-íntima podem ser distinguidos. A íntima é uma camada única de sinoviócitos e a camada sub-íntima é tecido areolar contendo pequenas estruturas vasculares. Comparado com os ligamentos cruzados, o envelope de membrana sinovial é relativamente celular. O recobrimento sinovial não ocorre nas superfícies de contato direto com o outro ligamento cruzado. O envelope sinovial torna as estruturas extra-sinoviais dos ligamentos cruzados protegidas dos efeitos de degradação do ambiente sinovial embora elas sejam intra-articulares (DE ROOSTER et al., 2006).

2.3.1 Células

O tipo celular predominante no LCCr é o fibroblasto. Três diferentes tipos de fibroblastos foram descritos: fusiforme, ovóide e esferóide. Diferentes tipos de fibroblastos ocorrem em diferentes regiões do ligamento cruzado anterior em humanos. Nas áreas adjacentes à inserção distal do ligamento cruzado anterior, as células são esferóides e podem estar localizadas dentro de lacunas ou entre feixes. Eles são mais comumente positivos para α -actina do músculo liso o qual é um marcador de miofibroblastos (HAYASHI et al., 2004).

Com base na morfologia do núcleo celular, vascularização e expressão de α -actina de músculo liso (α -smooth muscle actin-SMA), o LCCr do cão apresenta entre as espécies domésticas maior semelhança histológica com o dos humanos (MURRAY et al., 2001), o que justifica o grande número de trabalhos utilizando a espécie canina como modelo animal para estudo da ruptura do ligamento cruzado anterior e OA em humanos (ORFORD et al., 1983; STOCKWELL et al., 1983; KOBAYASHI et al., 1997; PANULA et al., 1998; LORENZ et al., 2004).

Em muitas situações fisiológicas e patológicas, alterações marcadas na arquitetura estrutural e bioquímica de fibroblastos e células com fenótipo de fibroblastos têm sido observadas, sugerindo uma forte plasticidade fenotípica permitindo grande adaptação (SCHMITT-GRAFF et al., 1994; MORAES et al., 2004).

Algumas citocinas e outros componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo podem exercer importante influência na diferenciação de fibroblastos. Estas influências apontam para uma população celular heterogênea em relação às proteínas que estão no citoesqueleto, as quais refletem uma característica funcional diferente em cada célula (SAPPINO et al., 1990).

Murray et al. (2000), estudando amostras de LCCr rompidos e íntegros em humanos coletados durante a cirurgia de tratamento da RLCCr, relatam a presença de células semelhantes a miofibroblastos marcadas por α -actina de músculo liso. Os miofibroblastos são células do tecido conjuntivo caracterizadas por seu aspecto alongado, cuja identificação não é possível em preparados corados com HE. A identificação dos miofibroblastos pode ser realizada por MET e imuno-histoquímica para α -actina de músculo liso. Estas células estão associadas com a reparação de lesões, participando do fechamento da lesão uma vez que possuem capacidade contrátil devido a presença de actina em seu citoesqueleto. Acredita-se que os miofibroblastos são fibroblastos modificados que surgem em resposta a estímulos decorrentes de lesão dos tecidos.

Kim e Spector (2000) estudaram a distribuição de condrócitos na cartilagem articular humana marcados pelo anticorpo α -actina de músculo liso utilizando a técnica imuno-histoquímica.

2.3.2 Colágeno

Os tendões e os ligamentos são compostos predominantemente por colágeno, que é a proteína mais abundante do organismo. O colágeno é capaz de suportar altas forças de tensão, isto é, o colágeno resiste ao estiramento. As fibras colágenas são os produtos polimerizados das moléculas precursoras solúveis que são secretadas pelos fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e outras células. No

tecido conjuntivo denso modelado as fibras são altamente polimerizadas, muito unidas e ordenadas de forma orientada, em resposta às forças de tensão exercidas sobre elas (BANKS, 1992).

No estado fresco as fibras colágenas têm cor branca conferindo esta coloração às estruturas nas quais predominam, como por exemplo, os tendões e os ligamentos. Quando observadas sob luz polarizada, as fibras que contêm colágeno são birrefringentes, pois são constituídas por moléculas alongadas arranjadas paralelamente umas às outras. Desse modo, quando examinadas ao microscópio de polarização, entre filtros polaróides, as fibras que contêm colágeno aparecem brilhantes contra um fundo escuro. Alguns corantes ácidos compostos por moléculas alongadas como, por exemplo, o Sirius Red, são capazes de se ligar paralelamente a moléculas de colágeno intensificando consideravelmente sua birefringência normal e produzindo cores variadas dependendo do grau de agregação de moléculas de colágeno. Devido a esta propriedade, o Sirius Red é usado como um método específico para a detecção do colágeno, quando observado sob luz polarizada. Usando-se as colorações mais comuns para colágeno, observa-se que, pelo fato das fibras colágenas serem acidófilas, apresentam-se coradas em rosa pela Eosina, em azul pelo Tricrômico de Mallory, em verde pelo Tricrômico de Masson e em vermelho pelo Sirius Red (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Com o método de Picrossírius associado à polarização, o grau de agregação do colágeno determina sua cor de birefringência. As fibras espessas aparecem de amarelo a vermelho e as fibras finas apresentam-se como estruturas esverdeadas (JUNQUEIRA, 1979).

As exigências biomecânicas nos tecidos sugerem que existe uma correlação entre a subestrutura e a função das fibras de colágeno. Estudando a correlação entre a estrutura interna de fibras do colágeno, seu diâmetro, sua disposição espacial e as exigências funcionais que suportam, os autores sugerem que as fibras de colágeno podem pertencer a dois grupos diferentes indicados como o " tipo T " e o " tipo C ". A primeira classe, consistindo de fibras grossas formadas por fibrilas de diâmetro, heterogêneo, paralelamente e firmemente organizadas, sujeita à tensão ao longo de sua linha central, é encontrada em estruturas altamente tensas tais como os tendões, os ligamentos e os ossos. A outra classe, consistindo de fibras finas formadas por fibrilas de diâmetro homogêneo, resistente a estresse multidirecional e

com arranjo helicoidal, está na maior parte dentro dos tecidos tais como parede dos vasos sanguíneos, arcabouço estrutural de órgãos expansíveis e bainhas nervosas (OTTANI et al., 2001).

As fibras reticulares são formadas predominantemente por colágeno do tipo III. São finas, com um diâmetro entre 0,5 e 2 μm , e formam uma rede extensa em certos órgãos. Estas fibras não são visíveis em preparados corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), mas podem ser facilmente coradas em cor preta por impregnação com sais de prata. As fibras reticulares também são PAS-positivas. Considera-se que tanto a positividade ao PAS (Ácido Periódico + Reativo de Schiff) quanto a argirofilia se devem ao alto conteúdo de cadeias de açúcar associadas a estas fibras. As fibras reticulares contêm 6-12% de hexoses, enquanto as fibras colágenas contêm apenas 1%. Ao microscópio eletrônico exibe estriação transversal típica do colágeno. São formadas por finas fibrilas frouxamente arranjadas, unidas por pontes provavelmente compostas de proteoglicanas e glicoproteínas. Devido ao seu pequeno diâmetro, as fibras reticulares mostram-se esverdeadas quando coradas pelo Sirius Red e observadas ao microscópio de polarização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Um estudo histométrico do LCCr em 30 cães, utilizou as técnicas de coloração de Picrossírius para fibras colágenas, Gordon para reticulina e Verhoeff para fibras elásticas. Este estudo quantificou as fibras em três regiões do LCCr (um segmento correspondente à origem no fêmur, um segmento médio proximal e um segmento correspondente à inserção na tíbia) citando que o ligamento é composto por fibras colágenas espessas entremeadas por fibras reticulares. A proporção de fibras colágenas é cerca de 43%, de fibras reticulares, 16,28% e de fibras elásticas 7,35%, sendo que há diminuição significativa de fibras reticulares com o aumento da idade (VIANNA, 2000).

2.3.3 Fibras do sistema elástico

O sistema elástico é composto por fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas. As fibras oxitalânicas não possuem elasticidade, mas são resistentes às forças de tração, enquanto as fibras elásticas, ricas em proteína elastina, distendem-se

facilmente quando tracionadas e retornam à sua conformação original quando a força de tração deixa de existir (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os diferentes tipos de fibras do sistema elástico podem ser especificamente demonstrados em cortes de tecidos, quando se compara o padrão ultra-estrutural típico de cada tipo de fibra com os resultados obtidos utilizando-se colorações seletivas para a microscopia de luz, associadas a digestões enzimáticas apropriadas e manipulação química. Em nível ultra-estrutural, uma fibra elástica típica consiste de dois componentes morfológicos distintos: um cilindro sólido central de elastina homogênea e amorfa circundado por fibras tubulares. Uma fibra oxitalânica compõe-se de um feixe de microfibrilas idênticas àquelas da fibra elástica, porém sem material amorfo (elastina). A distribuição das fibras oxitalânicas parece restringir-se a locais em que o tecido conjuntivo está sujeito a tensão mecânica, o que sugere que este tipo de fibra atua impedindo o estiramento de estruturas presentes nesses locais, uma vez que as fibras oxitalânicas não se alongam sob tensão mecânica (MONTES, 1992).

Pecora et al. (2001) realizaram em cadáveres humanos um estudo histomorfométrico do sistema de fibras elásticas através de métodos seletivos de coloração, com o objetivo de comparar os ligamentos cruzados da articulação do joelho com o ligamento patelar. Esses autores não encontraram diferença significativa na densidade linear de todo o sistema elástico. No entanto, relatam que a quantidade de fibras elásticas maduras e elaunínicas, fibras responsáveis pela elasticidade, foi maior no ligamento cruzado anterior e, que o ligamento cruzado posterior e o ligamento patelar têm mais fibras oxitalânicas, que são responsáveis pela resistência tecidual. E concluem que o ligamento cruzado posterior e o ligamento patelar têm estrutura semelhante e parecem mais relacionados à transmissão de força, enquanto o ligamento cruzado anterior está relacionado à elasticidade da articulação do joelho.

Sargon et al. (2004) investigando a estrutura do ligamento cruzado posterior em humanos de diferentes faixas etárias, verificaram que em jovens há uma maior presença de fibras oxitalânicas entre os feixes de fibra colágena e variabilidade no diâmetro das fibras, porém não observaram diferenças nas fibras do sistema colágeno nas diferentes faixas etárias.

2.3.4 Proteoglicanas

A substância fundamental intercelular é uma mistura complexa altamente hidratada de moléculas aniônicas (glicosaminoglicanas e proteoglicanas) e glicoproteínas multiadesivas. Esta complexa mistura é incolor, transparente preenchendo os espaços entre as células e fibras do tecido conjuntivo e atuando como lubrificante e barreira à penetração de microorganismos invasores. Quando adequadamente fixada para análise histológica, seus componentes se agregam e precipitam nos tecidos como um material granular que pode ser identificado em micrografias eletrônicas. A presença de polissacarídeos pode ser demonstrada pela reação de Ácido periódico-Schiff (PAS), que se baseia na transformação de radicais 1,2-glicol presentes nos açúcares em resíduos de aldeído. Os resíduos são revelados pelo reagente de Schiff, que produz uma coloração púrpura ou magenta nos locais do corte onde há muitos polissacarídeos. Glicogênio e glicoproteínas neutras são PAS positivas. Glicosaminoglicanas são polissacarídeos não ramificadas, fortemente aniônicas, que contêm monossacarídeos aminados (amino-açúcares). Quando um grande número de cadeias glicosaminoglicanas se prende ao longo de um eixo proteico elas constituem as proteoglicanas. As proteoglicanas são compostas de um eixo protéico associado a um ou mais dos quatro tipos de glicosaminoglicanas: dermatam sulfatado, condroitim sulfatado, queratam sulfatado e heparam sulfatado dando origem aos diversos tipos de proteoglicanas: agrecan (tecido cartilaginoso), sindecam (na membrana celular), perlecan (nas lâminas basais), decorin (em associação às fibras colágenas), entre outros. Glicosaminoglicanas e glicoproteínas ácidas são fortemente aniônicas por causa do seu alto conteúdo de grupos carboxila e sulfato. Por esta razão, elas reagem intensamente com o corante Alcian blue (JUNQUEIRA;CARNEIRO,2004).

A presença de agrecan em um tendão aumenta consideravelmente sua capacidade para absorver água e suportar compressão (BENJAMIN; RALPHS, 1998).

A parte glicídica das glicosaminoglicanas e proteoglicanas, pertencentes à substância fundamental amorfa (parte do tecido conjuntivo) é fortemente impregnada

pela coloração azul de Alcian. Essas proteínas sintetizadas pelos fibroblastos estão dispostas entre as células e as fibras do conjuntivo. Quando da presença de degeneração desse tecido, ocorre a destruição dessas proteínas, traduzida em grandes áreas de concentração da coloração azul, o que não acontece no tecido normal. A utilização desse método de coloração visa identificar áreas que estejam sofrendo processo de desagregação, não visíveis na coloração de Picrossírius (BARROCO; LEMOS; NERY, 1998).

As proteoglicanas estão intimamente associadas com as fibras de colágeno e podem ter uma função na morfogênese do tecido com colágeno, na manutenção deste tecido em ambas as situações (HASSELL; KIMURA; HASCALL, 1986).

O colágeno tipo II é sintetizado por condroblastos e apresenta intensa interação com proteoglicanas, componentes altamente hidratados cuja interação com o colágeno é responsável pela resistência da cartilagem para a intermitente ação da pressão (MONTES; JUNQUEIRA, 1982).

2.4 ALTERAÇÕES TECIDUAIS OCORRIDAS NA RUPTURA DO LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL

Vasseur et al. (1985) compararam amostras de LCCr retirados de cadáveres de cães sem histórico de doença articular com amostras obtidas cirurgicamente de LCCr rompidos e citam que uma lesão aguda pode causar a ruptura do LCCr ou avulsão dos seus locais de inserção no osso. A maioria das rupturas de LCCr é secundária às mudanças degenerativas crônicas dentro do próprio ligamento. Ocorrem mudanças degenerativas no LCCr de cães com 8 anos de idade ou mais consistindo de depósitos de cálcio, hialinização, perda da arquitetura do *crimp* e aparecimento de grupos de células cartilaginosas. Observou-se que a deterioração ocorreu mais cedo no interior do ligamento do que na superfície, e a porção média do ligamento deteriorou antes que as áreas mais próximas aos locais de inserção no osso. Nesse trabalho os autores estabeleceram critérios para graduar a doença degenerativa nas amostras e observaram que dificuldades técnicas encontradas na forma de incluir o material e em manter uma orientação precisa das amostras, permitiram fazer somente uma análise subjetiva das alterações degenerativas. Uma

vez que a quantidade e a qualidade dos danos microscópicos foram fatores essencialmente inseparáveis, um sistema de graduação foi usado para acomodar os dois. Os ligamentos sem mudanças estruturais aparentes receberam o grau 0, enquanto que grau 1, 2 e 3 estão relacionados à intensidade da doença degenerativa. Sendo assim o grau 1 incluiu um amplo espectro de mudanças degenerativas brandas afetando a população de ligamentócitos (fibroblastos) e os ramos primários de colágeno adjacentes. As lesões de grau 1 envolveram pequenas áreas, únicas ou múltiplas, de degeneração na região central do LCCr. Este grupo de mudanças sutis incluiu: (1) áreas de perda de ligamentócitos sem uma resposta pelos ligamentócitos adjacentes; (2) áreas com as características anteriores, mas também com deficiência na manutenção dos feixes primários de colágeno; (3) áreas acelulares sem proliferação de ligamentócitos, mas com perda na manutenção do padrão de organização normal das fibras de colágeno; (4) áreas acelulares intermediadas com uma leve proliferação dos ligamentócitos da região e com perda do padrão de organização normal das fibras de colágeno; (5) áreas acelulares misturadas com áreas de recente metaplasia condróide de ligamentócitos remanescentes e perda do padrão de distribuição dos feixes colágenos ou no feixe individual primário. O grau 2 incluiu uma gama de mudanças degenerativas moderadas afetando grandes áreas (até a metade do diâmetro do ligamento, mas no qual não houve rompimento óbvio nas fibras colágenas deterioradas). Neste grau 2, dois exemplos estão indicados: (1) grandes áreas de perda de ligamentócitos com metaplasia dos ligamentócitos remanescentes e falhas na manutenção dos feixes primários de colágeno e de seu padrão de organização; (2) grandes áreas acelulares com mineralização de ilhas de metaplasia condróide e falha na manutenção do colágeno. O grau 3 incluiu uma variedade de alterações degenerativas severas, nas quais mais da metade do diâmetro do ligamento estava envolvido e no qual houve rompimento das fibras axiais deterioradas. No grau 3 dois exemplos foram indicados: (1) grandes áreas acelulares contendo uns poucos condrócitos metaplásticos e fibras colágenas fragmentadas; (2) grandes áreas acelulares com completa separação dos grupos de fibras colágenas axiais deterioradas. Os autores também observaram calcificação distrófica em áreas degeneradas do ligamento, entretanto essa característica ocorreu de forma aleatória em grandes áreas de lesão dos graus 2 e 3 e não foi incluída como um critério para graduação. A calcificação foi

considerada um fenômeno secundário e não um fator significativo afetando a força mecânica do ligamento.

Galloway e Lester (1995) estudando a evolução histopatológica na membrana sinovial do joelho de cães com RLCCr sugeriram a ocorrência de um processo inflamatório iniciando uma resposta mediada por enzimas degradadoras de matriz e levando ao enfraquecimento e posterior ruptura do ligamento.

Hayash et al. (2004) relataram a diminuição da birrefringência e alongamento do *crimp* das fibras colágenas restantes no LCCr rompido e apontaram para a hipótese de sobrecarga mecânica progressiva. As mudanças adaptativas ou degenerativas não foram relacionadas com idade, sexo, peso corporal, ou duração da claudicação no cão. As mudanças celulares e na matriz que se desenvolvem no LCCr rompido podem resultar de efeitos de remodelação e adaptação de diversos fatores, assim como, inflamação da articulação, sobrecarga mecânica, microlesão do ligamento e isquemia.

Hayashi et al. (2003) realizaram um estudo para determinar as mudanças nas células e matriz extracelular amorfa e colágeno no LCCr rompido de cães. A densidade numérica de fibroblastos no ligamento e o fenótipo foram determinados na região central e na região epiligamentar. Verificaram a birefringência da matriz extracelular e a estrutura de *crimp* na região central. Alterações extensas na população celular e no colágeno foram vistas no LCCr rompido. Embora tenha sido visto um reparo proliferativo na região epiligamentar do ligamento cruzado junto ao fêmur, houve ausência de cicatriz entre as extremidades rompidas do ligamento. As mudanças nas características do LCCr de cães de grande porte, relacionadas com a idade incluem perda de fibroblastos do ligamento, degeneração progressiva de fibroblastos do ligamento, metaplasia dos fibroblastos remanescentes no ligamento para condrócitos e falha para manter as fibras colágenas normais e feixes de colágeno primários.

Comerford et al. (2005) em estudo a respeito da relação entre as características da matriz extracelular (MEC) e propriedades mecânicas do LCCr, citam que as propriedades mecânicas do ligamento são dependentes da composição e estrutura da MEC do tecido, particularmente o colágeno. A raça Labrador, considerada como predisposta a ruptura de LCCr, foi comparada à raça Greyhound, considerada como tendo um baixo risco de lesão no ligamento e não foram identificadas diferenças

significativas nas ligações cruzadas de colágeno maduro e imaturo, colágeno e glicosaminoglicanas entre essas raças.

Hayashi et al. (2004) relatam fases distintas de reparação dos tecidos, incluindo uma fase inflamatória, de reparo, proliferativa, e por último de remodelação, após a ruptura do ligamento cruzado anterior em humanos. Não há relato dessas fases em cães.

De Rooster et al. (2000) mediram e compararam os títulos para anticorpos do colágeno tipo I e II do líquido sinovial na articulação do joelho de cães com instabilidade causada pela ruptura total ou parcial do LCCr e em articulações com osteoartrose secundária a outras mudanças patológicas. Os títulos foram significativamente maiores nos cães com RLCCr quando comparados aos cães do grupo controle. Os cães com osteoartrose secundária a outras afecções ortopédicas também tiveram seus títulos aumentados, levando os autores a concluir que o aumento da quantidade de anticorpos para colágeno no líquido sinovial não foi específico para a ocorrência de RLCCr e que essa titulação aumentada pode aparecer em diferentes tipos de doença articular.

Comerford et al. (2006) estudaram as diferenças ultra-estruturais no LCCr em duas raças de cães que apresentam diferença na predisposição à RLCCr. Estes autores compararam amostras de LCCr normal de cães da raça Labrador considerando-a uma raça predisposta à RLCCr com amostras de ligamento normal de cães da raça Greyhound, considerando-a como não predisposta à RLCCr. Neste trabalho, os autores coletaram o LCCr íntegro de cadáveres de cães sem histórico de doença articular e sugeriram que a formação de fibrocartilagem deve-se à compressão das duas bandas sob tensão e é fisiológica e não patológica. A formação de fibrocartilagem nos Greyhounds poderia aparecer para ajudar na eficiência de corrida. A fibrocartilagem pode proteger o LCCr contra a fragmentação mecânica devido à compressão repetitiva. Os autores também relataram que o maior diâmetro das fibras de colágeno nos Greyhounds em relação às fibras dos Labradores pode refletir a maior condição de exercícios dos Greyhounds, a sua maior adaptação ao aumento de carga e um aumento do *turnover* do colágeno.

Neurath, Printz e Stofft (1994) investigaram a ultra-estrutura do ligamento cruzado cranial em humanos comparando amostras de ligamentos íntegros e

rompidos em diferentes fases pós-ruptura e constataram diferenças na distribuição e organização das fibrilas na matriz dos diversos grupos.

Gyger et al. (2006), estudando a morte celular por apoptose em LCCr normais e doentes, relataram que a atividade apoptótica foi maior nos ligamentos rompidos que nos normais. Ao examinar a produção de óxido nítrico nos tecidos articulares observaram uma correlação moderada, porém significativa, entre óxido nítrico e células com marcação positiva para Caspase-3 no ligamento. Os autores sugeriram que o aumento na apoptose na ruptura do LCCr, pode ser influenciada pela produção local de óxido nítrico.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – HOVET e Laboratório de Anatomia Macroscópica e Microscópica do Departamento de Cirurgia, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) e Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP).

O material estudado foi composto por 38 amostras de LCCr, coletadas durante o ato cirúrgico, de cães atendidos no referido Serviço no período de agosto de 2004 a agosto de 2006.

As informações a respeito do histórico clínico do animal, assim como os dados relativos à idade, sexo, peso corpóreo, foram registrados para estabelecer relações com os dados obtidos do processamento e análise do material.

3.1 COLETA DO MATERIAL

As amostras de LCCr rompidos foram coletadas durante a artroscopia para tratamento da afecção. Durante o procedimento foi utilizada pinça tipo *basket* para a coleta do material e limpeza da articulação.

Após a coleta os fragmentos foram imersos em paraformaldeído tamponado em PBS 4% por 24 horas e processados de acordo com os protocolos indicados para microscopia de luz.

As informações referentes à coleta do material durante o procedimento cirúrgico e dados do prontuário médico veterinário do animal foram registrados em uma ficha de coleta (Apêndice A).

3.2 GRUPOS

Foram formados 2 grupos principais:

Grupo cirúrgico: amostras de LCCr coletadas durante a artroscopia ou artrotomia para tratamento da lesão.

Grupo controle: amostras de LCCr coletadas de cadáveres congelados ou frescos.

3.2.1 Grupo cirúrgico

O grupo cirúrgico foi subdividido por grupos de raças nos seguintes subgrupos:

- 1-Rottweiler - 9 cães
- 2-Labrador - 4 cães
- 3-Pit bull - 9 cães
- 4-Outras raças - 11 cães
- 5-SRD - 6 cães

Essa divisão em subgrupos de raças ocorreu em função da diferença do número de casos atendidos.

Para cada animal as informações foram arquivadas sob um número correspondente ao seu número de prontuário médico do HOVET. Foram consideradas as seguintes informações: idade, sexo, peso, tempo de evolução e joelho acometido.

O tempo de evolução corresponde ao tempo entre o aparecimento da lesão e a data da cirurgia. A data de início da lesão corresponde à data informada pelo proprietário e que consta na ficha de exame clínico. Essa data diz respeito à percepção pelo proprietário do início dos sintomas clínicos.

3.2.2 Grupo controle

As amostras do grupo controle foram coletadas de 13 cadáveres de cães de raças variadas sendo coletadas até 2 horas após o óbito ou coletadas de cadáveres que foram mantidos congelados. Todos os cadáveres eram de animais adultos. A articulação do joelho foi examinada macroscopicamente e considerada saudável em função do aspecto das superfícies articulares que se apresentavam brilhantes e com a coloração branca característica. Os ligamentos cruzados cranial e caudal se apresentavam firmes e íntegros.

3.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

O material coletado foi processado em laboratório de acordo com os protocolos descritos a seguir.

3.3.1 Microscopia de luz

As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 24 horas e desidratadas em concentrações gradativas crescentes de álcool (50, 70, 85, 95, 100%), ficando cerca de 30 minutos em cada uma, diafanizadas em xilol (2 trocas de 30 minutos cada) e incluídas em blocos de parafina observando a orientação do material para possibilitar um corte adequado.

Os cortes de 5 μ m foram obtidos com auxílio de um micrótomo¹.

Utilizaram-se os seguintes métodos de identificação: Hematoxilina-Eosina (HE) para análise histopatológica (JUNQUEIRA, 1983); Resorcina-Fucsina com oxidação prévia para caracterização das fibras do sistema elástico (MONTES, 1992); Picrossírios (JUNQUEIRA et al., 1979) para caracterização das fibras de colágeno e

¹ Leica RM 2145

corante Alcian Blue pH2,5- PAS para observação de glicosaminoglicanas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Alguns fragmentos foram incluídos em historesina e utilizados para ilustrar este trabalho. Os cortes obtidos dessa inclusão foram corados por Hematoxilina de Harris e contra-corados com Fucsina básica 0,2 e Azul de Toluidina 0,1%.

3.3.1.1. *Hematoxilina-Eosina*

Os cortes histológicos de 5 μ m foram desparafinados, hidratados e corados durante 2 minutos em Hematoxilina de Harris². Em seguida foram lavados e corados por 10 minutos em Eosina³, diferenciados em álcool 70°, desidratados em uma série crescente de álcoois e montados.

3.3.1.2 *Picrossírius-Hematoxilina*

Os cortes histológicos de 5 μ m foram desparafinados, hidratados e corados durante uma hora numa solução 0,1% de Sirius Red⁴ dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Os cortes foram rapidamente lavados em água corrente e contra-corados com Hematoxilina de Harris por 6 minutos. Em seguida, foram lavados e montados.

² Vetec Química fina Ltda.

³ Synth- Labsynth produtos para laboratórios Ltda.

⁴ Sirius Red F 3 B 200, Mobay Chemical Co. Union, EUA

3.3.1.3 *Resorcina- Fucsina com oxidação*

Os cortes desparafinados e hidratados foram tratados com solução aquosa de Oxona⁵ a 10% por 40 minutos. Em seguida, foram lavados por 5 minutos em água corrente e passados em uma série crescente de etanol (70 a 95%). Então os cortes foram corados por 1 hora com Resorcina-Fucsina de Weigert⁶ e lavados novamente em água corrente por mais 5 minutos. Para remoção da coloração de fundo foi utilizada uma solução de álcool ácido 1% por alguns segundos e em seguida a desidratação, diafanização e montagem das lâminas.

3.3.1.4 *Alcian-Blue –PAS*

Os cortes histológicos de 5 µm obtidos foram desparafinados, hidratados e corados pela técnica de Alcian-Blue pH 2,5 P.A.S. utilizando-se o kit de coloração Easy Path 242081⁷, de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.1.5. *Resina*

Os cortes obtidos foram corados por 2 minutos pela Hematoxilina de Harris, lavados em água corrente por 2 minutos; contra-corados por 4 minutos em Fucsina básica⁸ 0,2%, lavados em água corrente por 5 minutos; contra-corados por 10 minutos em Azul de Toluidina⁹ 0,1% e lavados em água corrente. Após a coloração as lâminas foram secas em temperatura ambiente e montadas com lamínula.

⁵ DuPont, Wilmington, Delaware, EUA.

⁶ Casa Americana de artigos para laboratório Ltda., Sta. Cecília

⁷ EP- 242081, fabricado por Bio-Optica Milano Spa, Itália; importado por Erviegas Instrumental Cirúrgico.

⁸ Casa Americana de artigos para laboratório - Sta. Cecília

⁹ Merck, Darmstadt, Alemanha

O protocolo para inclusão do material em resina incluiu as seguintes etapas:

a-Desidratação:

Desidratar em álcool 70°, por uma noite; 2 banhos em álcool 95°, de 30 minutos cada; 4 banhos em álcool absoluto (total de 2 a 3 horas).

b- Preparação da resina:

A preparação da resina a partir do kit para historesina¹⁰ segue as seguintes etapas:

-Solução A:

Solução de peróxido de benzoila a 1% em Tecnovit 1 ou Historesin (hidroxietil metacrilato), preparada da seguinte maneira:

0,15 g de peróxido de benzoila

15 ml de Tecnovit 1

Agitar suavemente por 10 a 15 minutos.

A solução A foi usada para a pré-inclusão.

-Solução B:

5 ml da solução A

0,33 ml do polimerizador (Tecnovit 2).

Misturar cerca de 5 minutos.

Esta solução é usada para a inclusão propriamente dita e deve ser feita no momento de usar e mantida no gelo. Necessita-se cerca de 0,5 ml da solução por cápsula de gelatina.

c) Inclusão:

Colocar o material numa mistura 1:1 de solução A e álcool absoluto, por 12 horas, girando.

Colocar em resina pura, girando, por um período de 24 horas.

Encher as forminhas de plástico com a solução B recém-preparada; colocar o material com a superfície de corte próxima ao local que vai ser cortado; preencher totalmente com a resina a forminha de plástico (até ficar abaulado) e aplicar um

¹⁰ kit historesina Tecnovit

pedaço de plástico transparente na superfície; este procedimento serve para que a polimerização ocorra de maneira homogênea em todo bloco. Deixar polimerizar na estufa a 37 a 45° por 24 horas, no mínimo. Após as primeiras 6 a 8 horas, retirar o plástico da superfície para que a polimerização se complete.

Depois de polimerizar, soltar os blocos da forma.

d) Obtenção dos cortes histológicos:

Os blocos provenientes da inclusão devem ser colados em cubinhos de madeira (2x2x2 cm), e cortados no micrótomo com facas de vidro.

3.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Os fragmentos foram fixados em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH7,2, a temperatura ambiente por 2 horas. Os fragmentos foram pós-fixados primeiramente em solução de tetróxido de ósmio 1% a 4°C por 1 hora e em seguida em solução de acetato de uranila 1% *overnight*. Após cada solução fixadora, as amostras foram lavadas em solução de sacarose e cloreto de sódio por 1 a 3 minutos. Uma vez submetidas à desidratação progressiva em acetona (30° a 100°), foram incluídas em resina¹¹. Cortes ultrafinos de 60 a 90nm, obtidos com ultramicrotomo¹², foram montados em grades de cobre com *mesh* de 200 (ou 300) e corados com citrato de chumbo para, então, serem analisados ao microscópio eletrônico¹³.

¹¹ Araldite CY205

¹² Leica-Ultracut UCT

¹³ JEOL 1010

3.3.3 Imuno-histoquímica

Foram obtidos cortes de 3 μm em lâminas silanizadas (silane 12%)¹⁴. A técnica imuno-histoquímica para a pesquisa dos anticorpos α -actina de músculo liso e Caspase 3 foi realizada pelo método Biotina-estreptavidina peroxidase e seguiu as seguintes etapas descritas abaixo:

Hidratação e bloqueio

As lâminas foram desparafinadas e hidratadas e foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H_2O_2) 10V, 3%, por 7 vezes, de 5 minutos cada. A esse procedimento seguiu-se a lavagem com água e PBS.

Recuperação antigênica

A recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura com citrato PH 6.0 e após este período, as lâminas foram lavadas em PBS.

Incubação com o anticorpo primário

Os anticorpos primários Caspase-3 Goat policlonal título 1:100¹⁵ e Actina de Músculo Liso monoclonal¹⁶ título 1:10000 para material parafinado, foram diluídos em BSA e aplicados sobre os cortes de LCCr e cortes teciduais de controle positivo e negativo. As lâminas foram incubadas *overnight*.

Incubação com o anticorpo secundário e montagem

As lâminas então foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário ABC Kit Vectastain¹⁷. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB)¹⁶. As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de

¹⁴ 3-Aminopropil-trietoxi-silano- Sigma

¹⁵ Promega Corporation

¹⁶ Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA

¹⁷ Vector Laboratories Burlingame, CA, USA

Harris¹⁸. Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia¹⁹.

3.3.3.1 *α -actina de músculo liso*

A caracterização da população celular no ligamento foi conduzida por meio de ensaios imuno-histoquímicos visando a localização da proteína do citoesqueleto α -actina de músculo liso.

3.3.3.2 *Caspase-3*

A caracterização de células apoptóticas foi conduzida por meio de ensaios imuno-histoquímicos pela Caspase-3 ativada.

3.4 METODOLOGIA PARA ANÁLISE DOS RESULTADOS

A metodologia realizada para a análise dos resultados obtidos encontra-se descrita a seguir.

3.4.1 Análise dos dados epidemiológicos dos casos do HOVET

Os arquivos dos atendimentos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET/FMVZ/USP durante o período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006 foram

¹⁸ Merck, Darmstadt, Alemanha

¹⁹ Entellan, Merck

revisados a fim de se estabelecer uma relação dos casos de RLCC e o total de atendimentos nesse período. A análise desses arquivos foi utilizada também para determinar a proporção de RLCC em cada raça em função da frequência com que os cães destas raças são atendidos no HOVET.

Para estabelecer estas relações foram compilados os dados referentes ao número total de cães atendidos, o número de cães dentro de cada grupo racial e o número de cães com diagnóstico ou suspeita de RLCCr. Para os cálculos foram considerados apenas os casos novos (CN) evitando-se assim a repetição de um mesmo animal.

O teste estatístico de 2 proporções foi utilizado para comparar os dados epidemiológicos do HOVET. Foram consideradas significativamente diferentes as análises onde o valor de p foi igual ou menor a 0,05.

3.4.2 Análise do material coletado

As amostras coletadas foram submetidas a estudos qualitativos e quantitativos.

3.4.2.1 Análise histopatológica

Os cortes foram corados por HE e procedeu-se a observação da morfologia dos fibroblastos e características teciduais, em microscópio de luz²⁰.

O material incluído em resina e corado por Hematoxilina-Fucsina-Azul de toluidina também permitiu uma análise qualitativa do material, enquanto que a morfometria foi realizada em cortes de tecido incluído em parafina e corado por HE.

A observação do material nos cortes histológicos foi feita a fim de agrupar as amostras e numa tentativa de classificá-las em graus de degeneração tecidual levando em consideração a classificação descrita por Vasseur et al. (1985).

Os cortes corados por HE também foram analisados a fim de determinar a fração de área ocupada por alterações celulares. Para isso foram analisados entre 5

²⁰ Nikon Opitphot

e 10 campos aleatórios em cada corte histológico. Com o auxílio do programa de análises Image Pro Plus 6.0²¹, foi aplicado um retículo contendo 391 pontos com área relativa por ponto igual a 3420,71 μm^2 .

A fração de área ocupada por alterações celulares foi determinada contando-se o número de pontos incidentes sobre as estruturas identificadas como células com fenótipo condrocítico.

Para a determinar a fração de área ocupada por estas células com semelhança fenotípica a condrocitos o número de pontos coincidentes foi dividido pelo número total de pontos.

3.4.2.2 *Análise do colágeno*

Para o estudo quantitativo da fração de área do tecido ocupado por fibras que contém colágeno, foram analisadas as lâminas coradas com Picrossírius-Hematoxilina; por esta técnica o colágeno fibrilar aparece corado em vermelho intenso quando observado sob luz convencional.

Foram analisados entre 4 e 6 campos aleatórios por corte histológico.

Foram obtidas imagens digitais dos cortes histológicos, utilizando-se uma objetiva de 20 vezes. Para captação da imagem utilizou-se um sistema composto por microscópio²² acoplado a uma câmera de vídeo digital²³. As imagens digitais de alta resolução foram captadas pelo programa ACT-1 versão 2.62 2000 da NIKON em um microcomputador acoplado ao sistema.

As imagens obtidas foram processadas, com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0[®], de modo a selecionar, por escala de cores, apenas as fibras que contém colágeno, visualizadas por sua intensa coloração em vermelho. As imagens foram transferidas para o programa Image J[®], do National Institute of Health, que permitiu o cálculo da fração de área: a) do compartimento de referência, b) a área ocupada pelo colágeno fibrilar dentro deste compartimento.

²¹ Media Cybernetics, USA

²² Nikon DXM1200F

²³ Nikon Eclipse E600

3.4.2.3 *Análise das fibras do sistema elástico*

A análise das fibras do sistema elástico foi conduzida utilizando-se a técnica Resorcina-Fucsina de Weigert com tratamento prévio do corte histológico pela Oxona, que permite visualizar em uma única preparação todos os componentes do sistema elástico: as fibras elásticas, oxitalânicas e elaunínicas. No entanto esta técnica coloração usada neste estudo não permite distinguir os 3 tipos de fibras entre si.

Determinou-se a densidade linear das fibras do sistema elástico utilizando-se de 10 a 12 campos aleatórios por corte e uma objetiva de 40 vezes. Nesta análise foi utilizado o programa Image J (NIH) para a aplicação de um retículo de 12 linhas verticais paralelas, contendo 10 pontos cada uma, a área ocupada pelo tecido foi determinada contando-se o número de pontos incidentes sobre o tecido. Para a determinação da densidade linear (DL), foi contada cada intersecção das fibras do sistema elástico com as linhas verticais do retículo.

Essas intersecções das fibras com o sistema de linhas estão relacionadas com o comprimento das fibras por unidade de área, pela expressão $DL=2 \times N/a$, em que N é igual ao número de intersecções e a é área associada a cada ponto (PECORA et al., 2001).

3.4.2.4 *Análise de proteoglicanas*

Para o estudo quantitativo da fração de área do tecido ocupado por proteoglicanas, foram analisadas as lâminas coradas com pelo Alcian-Blue pH2,5 P.A.S. Por esta técnica coram-se em azul turquesa as regiões ocupadas por mucopolissacarídeos ácidos, em roxo ou azul escuro coram-se mucinas e cartilagens e em magenta vermelho coram-se as substâncias P.A.S. positivas.

Foram analisados entre 4 e 6 campos aleatórios por corte histológico. Foram obtidas imagens digitais dos cortes histológicos, utilizando-se uma objetiva de 20

vezes. Para captação da imagem utilizou-se um sistema composto por microscópio acoplado a uma câmera de vídeo digital²⁴. As imagens digitais de alta resolução foram captadas pelo programa ACT-1 versão 2.62 2000 da NIKON em um microcomputador acoplado ao sistema.

As imagens obtidas foram processadas, com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0[®], de modo a selecionar, por escala de cores, apenas a região do corte que contém proteoglicanas, visualizadas por sua coloração em azul. As imagens foram transferidas para o programa Image J[®], do National Institute of Health, que permitiu o cálculo da fração de área: a) do compartimento de referência, b) a área ocupada por proteoglicanas dentro deste compartimento.

3.4.2.5 Análise pela microscopia eletrônica de transmissão

Os cortes ultrafinos foram analisados ao microscópio eletrônico de transmissão, de forma qualitativa a fim de se fazer uma descrição da diferença ultra-estrutural entre o LCCr rompido e o LCCr íntegro.

3.4.2.6 Análise do material submetido ao estudo imuno-histoquímico

Para quantificar o número de células marcadas pelos anticorpos α -actina de músculo liso e caspase 3 ativada, foram obtidas imagens digitais dos cortes histológicos, utilizando-se uma objetiva de 40 vezes. Para captação da imagem utilizou-se um sistema composto por microscópio²⁵ acoplado a uma câmera de vídeo digital. As imagens digitais de alta resolução foram captadas pelo programa ACT-1 versão 2.62 2000 da NIKON em um microcomputador acoplado ao sistema. Nesta análise foi utilizado o programa Image J (NIH) para determinar a área de realização

²⁴ Nikon DXM1200F

²⁵ Nikon Eclipse E600

da contagem de células marcadas pela imuno-histoquímica. Dessa forma o compartimento de área foi o mesmo para todos os campos histológicos analisados.

3.4.3 Análise estatística

Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística. Foram utilizados os programas SPSS 13.0, Minitab 14 e Sigma Stat 3.1. Inicialmente foi necessária a verificação de normalidade do grupo para indicar o teste a ser usado quando da comparação entre os grupos. Testes paramétricos podem ser usados se há um padrão de normalidade nas amostras de um mesmo grupo, enquanto a ausência de normalidade exige um teste não paramétrico para análise comparativa dos grupos. Para o estudo de homogeneidade em cada grupo de estudo foram utilizados os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk.

Para realizar comparações entre os grupos foram utilizados os testes estatísticos ANOVA, teste de Tukey, teste de Dunnett, teste de Kruskal-Wallis e teste Mann-Whitney .

O teste qui-quadrado foi utilizado para comparação dos grupos quanto ao membro afetado e quanto à proporção entre machos e fêmeas.

Análises de correlação entre as variáveis foram feitas através de teste de correlação de Spearman.

O teste de duas proporções foi realizado para comparações entre os dados epidemiológicos.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

A seguir encontram-se descritos os resultados obtidos com este trabalho.

4.1 ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS RAÇAS PREDISPOSTAS À RUPTURA DO LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL

Foram atendidos 29213 cães no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais/HOVET/FMVZ/USP no período entre janeiro de 2004 e dezembro de 2006. Esse número correspondeu a todos os registros constantes do arquivo de dados e foram considerados os casos novos (CN), as intervenções cirúrgicas (IC) e os retornos (R).

Desse total de cães atendidos, 10319 foram casos novos. Para os cálculos descritos a seguir foram considerados apenas os casos novos, evitando assim a contagem repetida de um mesmo animal.

Para efeito deste estudo epidemiológico foram consideradas apenas as raças onde o diagnóstico de RLCCr esteve presente. Não foram consideradas as demais raças que constam nos arquivos de atendimento do HOVET com diferentes patologias.

Os cães SRD representaram o maior número de atendimentos (3054 CN) entre 2004 e 2006 enquanto que as raças Flat Coated Retriever e Dogue de Bordeaux contaram com apenas um animal cada uma.

Entre os registros de ocorrência de RLCCr foram encontrados animais de 31 diferentes raças. O número de animais acometidos de RLCCr de cada raça foi comparado com o total de animais atendidos da raça.

As informações referentes à compilação dos dados dos arquivos do HOVET encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1- Distribuição dos animais com diagnóstico de RLCCr atendidos no HOVET/FMVZ/USP entre 2004 e 2006 - São Paulo - 2007

Raças	Total de CN		% de CN das raças em relação ao total de CN		% de CN com RLCCr em relação ao total de CN da raça	
		Nº de CN com RLCCr				
Flat Coated Retriever	1	1	0,01		100	
Dogue de Bordeaux*	1	1	0,01		100	
Bulldog Francês	2	1	0,02		50	
American Staffordshire Terrier	8	4	0,08		50	
Jack Russel Terrier	3	1	0,03		33,33	
Bulldog Inglês*	28	5	0,27		17,86	
Bichon Frisé	37	6	0,36		16,22	
Pit bull*	260	42	2,52		16,15	
Chow-chow*	40	5	0,39		12,5	
Mastin Napolitano	11	1	0,11		9,09	
Rottweiler*	538	46	5,21		8,55	
Beagle	83	7	0,80		8,43	
São Bernardo	24	2	0,23		8,33	
Dogo Argentino	13	1	0,13		7,69	
Shar-pei	15	1	0,15		6,67	
Dálmata*	35	2	0,34		5,71	
Mastiff	18	1	0,17		5,55	
Maltês	74	4	0,72		5,4	
Yorkshire Terrier	176	8	1,71		4,54	
Lhasa apso*	123	5	1,19		4,06	
Boxer*	363	14	3,52		3,86	
Labrador*	353	13	3,42		3,68	
Weimaraner	55	2	0,53		3,64	
Poodle*	1462	52	14,17		3,55	
Pinscher	456	10	4,42		2,19	
Schnauzer	103	2	1,00		1,94	
SRD*	3054	47	29,60		1,54	
Fox Paulistinha	140	2	1,36		1,43	
Fila Brasileiro	93	1	0,90		1,07	
Cocker Spaniel*	482	5	4,67		1,04	
Pastor Alemão	444	1	4,30		0,22	

* raças com material coletado para este estudo

Considerando todas as raças com registro de RLCCr, a maior proporção foi observada nas raças Flat Coated Retriever e Dogue de Bordeaux com 100% e a menor proporção ocorreu na raça Pastor Alemão (0,22%). Entretanto, esses extremos foram excluídos da análise estatística por representarem uma amostra muito pequena (1 animal de cada raça). Também foram excluídas da análise estatística as raças onde o número de animais atendidos no HOVET (CN) foi inferior a 28.

Os animais avaliados neste estudo epidemiológico pertencem às seguintes raças: Rottweiler, Pit bull, Labrador, Boxer, Poodle, Bulldog Inglês, Chow chow, Lhasa apso, Cocker Spaniel, Dogue de Bordeaux, Dálmata, e SRD (sem raça definida), sendo essas as raças das quais fragmentos de LCCr rompido foram histopatologicamente analisados.

Para a análise estatística desses dados foi excluída a raça Dogue de Bordeaux, pois foi registrado apenas 1 atendimento nos 3 anos analisados.

Nas demais raças o número de animais por grupo variou entre 28 na raça Bulldog Inglês e 3054 no grupo SRD.

A maior proporção de ocorrência da RLCCr foi na raça Bulldog Inglês (17,86%) e a menor na raça Cocker Spaniel (1,04%). Essa diferença foi estatisticamente significativa sendo $p=0,02$. Considerando a proporção entre o número de atendimentos (CN) destas raças e o total de atendimentos (CN), os cães da raça Bulldog Inglês representaram 0,27% e os da raça Cocker Spaniel 4,67%, valores estatisticamente diferentes.

A raça Bulldog Inglês difere significativamente quanto à proporção de RLCCr das raças: Rottweiler, Boxer, Labrador, Poodle, SRD, Cocker Spaniel e Pinscher, embora esta última não conste no grupo cirúrgico deste trabalho.

Considerando as raças com maior frequência no grupo cirúrgico de estudo (Pit bull, Rottweiler e Labrador) a maior proporção ocorreu nos Pit bulls (16,15%), seguidos pelos Rottweilers (8,55%) e Labradores (3,68%). A análise estatística revelou que a diferença entre a proporção de RLCCr na raça Pit bull foi significativa em relação às raças Rottweiler ($p=0,003$) e Labrador ($p=0,0001$). Rottweiler e Labrador também apresentaram diferença estatisticamente significativa entre elas ($p=0,002$). Os níveis de significância estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2- Níveis de significância da análise comparativa da frequência de RLCCr entre raças, considerando os atendimentos entre 2004 e 2006 no HOVET/FMVZ/USP - São Paulo - 2007

Raças	Bulldog	Chow		Lhasa						Cocker	
	Inglês	Pit bull	chow	Rottweiler	Dálmata	apso	Boxer	Labrador	Poodle	SRD	Spaniel
Bulldog Inglês	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	S
Pit bull	NS	-	NS	S	S	S	S	S	S	S	S
Chow-chow	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS		S
Rottweiler	NS	S	NS	-	NS	S	S	S	S		S
Dálmata	NS	S	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS	S	NS
Lhasa apso	NS	S	NS	S	NS		NS	NS	NS	S	S
Boxer	NS	S	NS	S	NS	NS	-	NS	NS		S
Labrador	S	S	NS	S	NS	NS	NS		-	NS	S
Poodle	S	S	NS	S	NS	NS	NS		NS	-	S
SRD	S	S	S	S	NS	NS	S	S	S		NS
Cocker Spaniel	S	S	S	S	NS	NS	S	S	S	S	

NS-não significativo ($p>0,05$); S-significativo ($p\leq 0,05$)

Neste trabalho os resultados de análise de material referem-se a 12 raças cujos animais foram submetidos à intervenção cirúrgica para tratamento da RLCCr possibilitando a coleta do material.

4.2 DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS ESTUDADOS

Foram coletadas amostras de LCCr íntegro de 13 cadáveres e amostras de LCCr rompido de 38 animais submetidos à cirurgia.

Os dados referentes à idade, raça, sexo, peso corpóreo foram registrados e encontram-se descritos nos quadros 1 e 2. No grupo dos animais operados foi registrado também o tempo de evolução da lesão.

4.2.1 Grupo cirúrgico

Foram acompanhadas 39 cirurgias de cães com RLCCr, sendo 9 da raça Rottweiler (23,1%), 9 da raça Pit bull (23,1%), 4 Labradores (10,2%), 6 cães sem raça definida (15,4%), 3 da raça Boxer (7,7%), 2 Poodles (5,1%), 1 Bulldog Inglês (2,6%), 1 Chow chow (2,6%), 1 Lhasa apso (2,6%), 1 Cocker Spaniel (2,6%), 1 Dogue de Bordeaux (2,6%) e 1 Dálmata (2,6%) . A distribuição das raças do grupo cirúrgico encontra-se ilustrada no gráfico 1. No grupo sem raça definida (SRD) o animal nº 37 não possuía mais nenhum resquício de LCCr dentro da articulação. Portanto os estudos realizados incluem 5 animais SRD e totalizam 38 amostras de LCCr rompido.

Considerando o total de cães operados foram 14 machos, sendo 1 macho vasectomizado e 25 fêmeas sendo 7 delas castradas. O peso corpóreo variou entre 4,5 e 45 Kg seguindo o padrão esperado para cada raça. Em 57,9% dos casos a articulação acometida foi o joelho esquerdo e em 42,1% o joelho direito. O tempo de evolução da lesão, contado a partir da data fornecida pelo proprietário para o início dos sintomas, variou de 1 a 18 meses.

O quadro 1 resume as características dos animais do grupo cirúrgico.

Os cães de número 2, 7, 19 e 32 foram operados novamente para tratamento da RLCCr no joelho contra lateral. O intervalo entre as cirurgias foi de 13, 21, 9 e 4 meses respectivamente. O cão nº 32 tinha diagnóstico de luxação medial de patela em ambos os joelhos no momento das cirurgias.

CÃO Nº	PRONTUÁRIO	IDADE (anos)	SEXO	PESO (Kg)	RAÇA	TEMPO DE EVOLUÇÃO (meses)	DE JOELHO ACOMETIDO
1	151279	2	FC	38	Rottweiler	1	E
2	151280	2	F	45	Rottweiler	1	E
3	152916	6	F	39,2	Rottweiler	5	E
4	153947	4	FC	41,5	Rottweiler	NC	D
5	154967	1	F	41,8	Rottweiler	9	E
6	157676	2	FC	35,9	Rottweiler	8	E
7	158282	1,7	M	42,5	Rottweiler	2	D
8	167826	8	F	37	Rottweiler	4	D
9	169244	3	FC	43	Rottweiler	6	E
10	163053	6	F	31	Labrador	2	E
11	164231	1,5	M	42	Labrador	11	E
12	164578	2	F	30	Labrador	2	E
13	166984	2	M	40	Labrador	12	D
14	149013	4	F	25,9	Pit bull	10	E
15	154937	4	M	37	Pit bull	4	E
16	161725	2	M	30,2	Pit bull	12	D
17	165754	3,5	M	31,5	Pit bull	1	E
18	167622	3	F	26,5	Pit bull	5	D
19	170130	5	F	34	Pit bull	12	E
20	171457	2	M	26	Pit bull	4	D
21	172070	4	MV	41	Pit bull	4	E
22	173496	3	F	24,4	Pit bull	6	D
23	150798	3,5	F	22	Bulldog Inglês	3	D
24	156827	2	FC	21,5	Boxer	3	D
25	160604	1,6	F	26	Chow chow	18	D
26	160987	3,5	F	36	Boxer	2	E
27	162162	1	M	26	Boxer	1	E
28	163846	8	M	6,7	Lhasa apso	1	E
29	164378	10	FC	15	Cocker spaniel	NC	D
30	167844	7	M	4,5	Poodle	1	E
31	168270	3	F	40	Dogue de Bordeaux	8	E
32	171187	5	M	5,6	Poodle	2	D
33	173384	7	M	27,6	Dálmata	6	E
34	129030	4	FC	22	SRD	1	E
35	154986	8	F	15	SRD	2	D
36	164148	4	M	28	SRD	NC	E
37	165330	5	F	8	SRD	NC	E
38	167536	2	F	16	SRD	1-2	D
39	168359	9	F	10,7	SRD	NC	D

FC- fêmea castrada; F- fêmea; M- macho; MV- macho vasectomizado; NC- não consta; E- esquerdo; D- direito.

Quadro 1- Descrição dos animais do grupo cirúrgico - São Paulo - 2007

Gráfico 1- Distribuição das raças do grupo cirúrgico das amostras de LCCr - São Paulo - 2007

4.2.2 Grupo controle

Dos 13 cadáveres do grupo controle deste estudo, 6 eram de cães sem raça definida e 7 de cães das raças Fila Brasileiro, Boxer, Poodle, Pastor Alemão, Rottweiler, Pit bull e Labrador, sendo um animal de cada uma dessas raças citadas.

Foram 4 fêmeas e 9 machos e o peso corpóreo variou entre 12 e 45 Kg.

As características dos animais do grupo controle encontram-se detalhada no quadro 2.

CÃO Nº	IDENTIFICAÇÃO	SEXO	PESO (Kg)	RAÇA	JOELHO	CONDIÇÃO DE COLETA
40	Controle 1 (C1)	F	30	SRD	E	fresco
41	Controle 2 (C2)	M	30	SRD	E	fresco
42	Controle 3 (C3)	F	25	SRD	E	fresco
43	Controle 4 (C4)	M	25	SRD	E	fresco
44	Controle 5 (C5)	F	25	SRD	E/D	congelado
45	Controle 6 (C6)	M	20	SRD	E	congelado
46	Controle 7 (C7)	M	45	Fila	E	fresco
47	Controle 8 (C8)	F	25	Boxer	E	fresco
48	Controle 9 (C9)	M	12	Poodle	E	fresco
49	Controle 10 (C10)	M	25	Pastor	E	fresco
50	Controle 11 (C11)	M	40	Rottweiler	E/D	fresco
51	Controle 12 (C12)	M	35	Pit bull	E	fresco
52	Controle 13 (C13)	M	38	Labrador	E	fresco
53**	Controle 14 (C14)	M	40	Rottweiler	E/D	fresco

(**) O material foi utilizado somente para a análise ultra-estrutural. F- fêmea; M- macho; E- esquerdo; D- direito.

Quadro 2- Descrição dos animais do grupo controle - São Paulo - 2007

4.2.3 Análise estatística dos grupos

As informações referentes aos grupos foram submetidas a uma análise estatística para determinar a homogeneidade de cada um desses grupos. Os resultados encontram-se descritos a seguir:

As variáveis idade e peso foram submetidas aos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para um estudo da homogeneidade dos grupos quanto a essas variáveis. Considerando nível de significância de 5%, os grupos foram considerados vindos de populações normais em relação às variáveis analisadas. Dessa forma os grupos foram comparados quanto a média utilizando teste ANOVA.

Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição da idade dos grupos considerados (teste ANOVA com $p=0,302$). Portanto, as amostras foram homogêneas considerando a variável idade (Gráfico 2). No grupo controle a idade

não pode ser comprovada. No entanto, o grupo controle foi formado por animais adultos e não foram incluídos animais idosos.

Gráfico 2- Distribuição dos animais do grupo cirúrgico em relação à idade - São Paulo - 2007

Foi encontrada diferença significativa quanto a média de peso dos grupos (teste ANOVA com $p=0,001$). O teste de Tukey foi aplicado para comparar todos os grupos entre si e o teste de Dunnett para cotejar cada grupo com o grupo controle.

O único grupo que difere significativamente do controle é o grupo Rottweiler, que possui média de peso significativamente maior que o grupo controle, confirmado tanto pelo teste de Tukey ($p = 0,002$) como pelo teste de Dunnett ($p = 0,001$). O grupo de Raças variadas e o grupo SRD apresentaram diferença significativa em relação aos outros grupos de LCCr rompido mas não em relação ao grupo controle.

A distribuição dos valores de peso corpóreo está ilustrada no gráfico 3.

Gráfico 3- Distribuição dos animais (grupos cirúrgico e controle) quanto ao peso corpóreo - São Paulo- 2007

Não foi observada diferença significativa na proporção de fêmeas e machos nos grupos estudados (Gráfico 4). Foi utilizado o teste qui-quadrado com $p = 0,108$.

Gráfico 4- Proporção entre machos e fêmeas em cada grupo - São Paulo - 2007

Também não foi notada diferença significativa na proporção de membros esquerdos e direitos nos grupos estudados (teste qui-quadrado com $p = 0,385$). O gráfico 5 ilustra essa proporção.

Gráfico 5- Proporção de articulação acometida (joelho direito e joelho esquerdo) em cada grupo- São Paulo- 2007

O tempo de evolução foi descrito em meses e correspondeu ao intervalo de tempo entre o início dos sintomas (segundo as informações do proprietário do animal) e a data da cirurgia, quando foi coletada a amostra de LCCr rompido. A variação no tempo de evolução encontra-se ilustrada no gráfico 6. Determinando nível de significância de 5%, e utilizando testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, os grupos foram considerados vindos de populações normais em relação ao tempo de evolução e comparados então quanto à média utilizando o teste ANOVA. As amostras foram homogêneas considerando a variável tempo de evolução ($p = 0,498$).

Foi encontrada correlação negativa significativa entre a idade e o peso, onde o peso diminuiu na proporção em que a idade aumentou. O teste de Spearman indicou coeficiente de correlação de $-0,419$ e $p=0,010$.

Entre as variáveis peso e tempo de evolução foi encontrada correlação positiva significativa, ou seja, quanto maior foi o tempo de evolução, maior foi o peso. O teste de Spearman indicou coeficiente de correlação de $0,366$ e $p=0,040$.

Gráfico 6- Distribuição dos animais do grupo cirúrgico quanto ao tempo de evolução da lesão- São Paulo- 2007

4.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Uma análise histopatológica foi realizada a fim de descrever as características encontradas nos fragmentos de LCCr íntegros e rompidos.

4.3.1 Grupo controle

O LCCr normal é composto primariamente por tecido conjuntivo denso modelado, formado por feixes paralelos de fibras colágenas, entre os quais existem fibroblastos e uma pequena quantidade de substância fundamental amorfa.

Os cortes histológicos longitudinais evidenciam as fibras de colágeno tipo I, com alto grau de agregação, que estão arranjadas paralelamente formando feixes dispostos no sentido do maior eixo do ligamento.

Paralelamente aos feixes de colágeno os fibroblastos dispõem-se alinhadamente em fileiras. Os fibroblastos são células com núcleos fusiformes e alongados. Nos preparados histológicos seu citoplasma é de difícil visualização

(Figuras 1 A e 1 B). Em alguns cães do grupo controle foram observados fibroblastos com a forma diferenciada, alguns se mostravam mais arredondados.

Figura 1- Cão N° 43. Fotomicrografia do LCCr íntegro em corte longitudinal; Hematoxilina-Fucsina-Azul de toluidina. A- Observar a alinhamento regular e ordenado dos feixes de fibras de colágeno (*). B- Os fibroblastos apresentam núcleo alongado e dispõem-se em fileiras paralelas aos feixes (seta); um delicado tecido conjuntivo frouxo (*) separa os feixes de fibras.

Em corte transversal (Figuras 2 A e B) pode-se observar a arquitetura do colágeno no LCCr, os feixes menores de colágeno formam conjuntos de feixes (fascículos) envolvidos por tecido conjuntivo frouxo no qual predominam fibras mais finas.

Figura 2- Cão N° 43. Fotomicrografia do LCCr íntegro em corte transversal, Hematoxilina-Fucsina- Azul de toluidina. A- Observar a organização das fibras de colágeno em feixes(----) e fascículos (----). B- observar a localização dos fibroblastos perifericamente aos feixes (seta).

Quando corado pelo método do Picrossírius podemos observar a presença dos *crimps*, que são característicos das fibras colágenas de tecidos conjuntivos submetidos a grandes forças de tensão (Figuras 3 A e 3 B). Os *crimps* das fibras de colágeno apresentaram espessura variável e o comprimento das fibras não foi determinado.

Figura 3- Cão Nº 43. Fotomicrografia do LCCr íntegro em corte longitudinal; Picrossírius-hematoxilina. A- Observar a organização das fibras de colágeno em feixes paralelos (*) e sua aparência ondulada (*crimp*) (---). B- Em maior aumento, observar a localização dos fibroblastos periféricamente aos feixes (seta) e com seus núcleos paralelos as fibras.

O LCCr mostrava-se recoberto pela membrana sinovial, que é constituída por duas ou três camadas de células que se apóiam sobre um tecido conjuntivo frouxo, separando-a dos grandes feixes de colágeno.

Com relação às fibras do sistema elástico no LCCr íntegro observou-se uma pequena quantidade de fibras do sistema elástico entremeadas entre os feixes de fibras de colágeno, dispostas paralelamente a eles (Figura 4 A). Nas regiões de tecido conjuntivo frouxo entre os feixes de fibras de colágeno, as fibras do sistema elástico mostraram-se mais numerosas e espessas e apresentaram disposição irregular (Figura 4 B).

Figura 4- Cão Nº 44. Fotomicrografia do LCCr íntegro em corte longitudinal, RFO. A- Observar a pequena quantidade de fibras do sistema elástico (seta) entremeadas entre os feixes de fibras de colágeno dispostas paralelamente a eles. B- Observar no tecido conjuntivo entre os feixes de fibras de colágeno, que as fibras do sistema elástico são mais numerosas e espessas e com disposição irregular (setas brancas).

4.3.2 Grupo cirúrgico

Os fragmentos de LCCr rompidos analisados neste estudo mostraram diversas alterações teciduais. As análises histopatológicas revelaram uma grande variedade de alterações presentes nos LCCr rompidos tais como perda de fibroblastos, metaplasia condróide dos fibroblastos, alterações na forma dos fibroblastos, perda da hierarquia estrutural do colágeno tipo I dentro da matriz extracelular, incluindo a perda do *crimp* e desorganização dos feixes até a formação de grandes áreas de tecido condróide com áreas de mineralização.

O estudo das fibras do sistema elástico realizado nas amostras de LCCr rompido também mostrou a perda do padrão de organização destas fibras. Em cortes longitudinais (Figuras 5 A e 5 B) observou-se a perda do alinhamento paralelo das fibras do sistema elástico com relação às fibras de colágeno. Algumas vezes, as fibras do sistema elástico exibiram uma forma espiralada e não mais a aparência linear que era evidenciada nos LCCr íntegros.

Figura 5- A- Cão Nº 34; B- Cão Nº 1. Fotomicrografia do LCCr rompido em corte longitudinal, RFO . A e B- observar a perda do alinhamento paralelo das fibras do sistema elástico (seta) com relação as fibras de colágeno(*).

Em alguns casos as extremidades rompidas mostraram-se revestidas por tecido sinovial que recobre o LCCr, dando uma aparência de estruturas arredondadas aos fragmentos.

A morfologia dos fibroblastos freqüentemente foi vista modificada em relação ao formato característico deste tipo celular. Foram observados fibroblastos arredondados e muitas vezes assemelhando-se a condrócitos. Esse tipo de alteração celular foi denominado “metaplasia condróide”, uma vez que os fibroblastos perderam sua aparência característica e passaram a exibir um fenótipo condrocítico.

Durante a cirurgia para tratamento da RLCCr e estabilização da articulação do joelho, os resquícios de LCCr rompidos são retirados e a cartilagem articular é avaliada. Nos animais dos quais o material deste trabalho foi retirado, não havia a presença de fragmentos livres da cartilagem articular.

Considerando as observações e os dados da literatura (VASSEUR et al., 1985) que também relata esse tipo de alteração, uma análise qualitativa e quantitativa desta metaplasia condróide foi realizada, bem como uma classificação dos casos deste grupo de acordo com o grau de lesão.

4.3.2.1 Classificação do Ligamento cruzado cranial em graus de degeneração

As amostras de LCCr rompido foram agrupadas e classificadas em graus de acordo com as alterações teciduais apresentadas. Assim como Vasseur et al. (1985) sugere em seu artigo, as amostras foram classificadas de grau 0 a 3.

Segundo a análise descritiva das alterações teciduais foi observado que 42,10% encontram-se classificados em grau 1, 23,68% em grau 2; 28,94% em grau 3 e 7,6% foram incluídos em grau 0.

O grau 0 foi caracterizado por apresentar os feixes de fibras colágenas organizados, mantendo um padrão de *crimp* característico e fibroblastos apresentando sua morfologia usual.

O grau 1 (Figuras 6A e 6B) caracterizou-se pela manutenção do padrão de *crimp* das fibras de colágeno e pela integridade dos feixes espessos, presença de fibroblastos com núcleos arredondados em pequenas áreas dos cortes histológicos, assim como algumas poucas células exibindo alteração do tecido ligamentar.

Figura 6 - Fotomicrografias de LCCr rompidos classificados em Grau I. A- Cão Nº 22. Corte transversal observar a perda da organização dos feixes de fibras de colágeno e a presença de fibroblastos arredondados (seta), HE; B- Cão Nº 35. Observar área de alteração do tecido ligamentar (*) e a manutenção do *crimp* (seta), PSH.

No grau 2 (Figuras 7A e 7B) enquadram-se os casos em que há uma desorganização dos feixes de fibras colágenas mais acentuada com perda do padrão de *crimp*. Porém ainda observam-se áreas onde o padrão característico dos feixes de colágeno está mantido, presença de áreas de conjuntivo frouxo entre os feixes e com aumento na densidade de fibroblastos normais e de aparência arredondada.

Figura 7- Cão Nº 19. Fotomicrografias de LCCr rompidos classificados em Grau II. A- Corte longitudinal - observar a perda da organização da matriz colágena em feixes de fibras; aumento na densidade de fibroblastos, HE; B- Observar a perda de alinhamento dos fibroblastos e sua aparência mais arredondada e áreas de metaplasia condróide (seta), PSH.

No grau 3 (Figuras 8A, 8B e 8C) foram inseridos os casos em que verificou-se as alterações teciduais mais intensas. Nestes há grandes áreas degradadas, os feixes de fibras de colágeno perderam o padrão de organização; e se nota a ruptura dos feixes de colágeno; ainda há a presença de fibroblastos exibindo característica condróide entre os feixes; e em alguns casos áreas de mineralização do tecido. Entre os cães da raça Rottweiler, 5 foram classificados em grau 1, 1 cão em grau 2 e 3 no grau 3.

Figura 8- Fotomicrografias de LCCr rompidos classificados em Grau III. A- Cão N° 11. Observar a perda da matriz colágena e da organização das fibras em feixes longitudinais paralelos, áreas de metaplasia condróide, HE. B- Cão N° 20. Ilhas de mineralização (*); Resorcina-Fucsina- azul de toluidina;. C- Cão N° 20. Observar a desorganização da matriz, PSH.

Na raça Labrador, um cão pertence ao grau 2 e 3 cães ao grau 3. Entre os Pit bulls, um cão foi classificado com grau 0, não apresentando as alterações teciduais encontradas para degeneração, dois cães foram classificados no grau 1, 4 cães no grau 2 e 2 cães no grau 3.

No grupo que reúne cães de raças variadas o grau 0 incluiu 1 animal, o grau 5 dois animais, o grau 2 teve 2 animais e o grau 3 contou com 3 animais.

Nogrupo dos cães SRD, 4 animais estão no grau 1 e um animal no grau 2. Não houve amostras nesse grupo que apresentassem as lesões teciduais características do grau 3.

A distribuição dos cães do grupo cirúrgico em graus encontra-se no quadro 3.

Cão		Nº	
Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
15	17	18	11
24	38	30	12
	8	19	32
	39	16	3
	22	36	5
	33	14	10
	9	1	29
	4	13	2
	35		25
	7		20
	34		
	23		
	21		
	31		
	6		
	28		

Quadro 3- Distribuição dos animais do grupo cirúrgico em graus de degeneração do LCCr- São Paulo- 2007

4.4 ESTUDO MORFOMÉTRICO

Um estudo morfométrico foi realizado para quantificar estruturas celulares e da matriz extracelular nos fragmentos de LCCr.

4.4.1 Estudo morfométrico da área ocupada por metaplasia condróide

A mensuração da área de ocorrência de metaplasia condróide foi determinada estimando-se a da fração de área ligamentar substituída por tecido alterado.

No grupo controle, a média de área ocupada por alterações celulares correspondeu a 0,50 %. Em 9 animais deste grupo foram observadas células com morfologia semelhante a condrócitos. Em 8 animais essa área variou entre 0,03% e

1, 23%. Em um Labrador, o LCCr coletado do joelho esquerdo tinha 1,74% de área ocupada por células semelhantes a condrócitos. Este animal tinha histórico de RLCCr direito.

Nos animais do grupo cirúrgico a média da fração de área ocupada por metaplasia condróide foi de 0,40% nos animais de raças variadas, 0,30% no grupo SRD, 1,56% nos Rottweilers, 1,66% nos Pit bulls e 2,44% nos Labradores (Tabela 3, Gráfico 7).

Tabela 3- Fração de área ocupada por metaplasia condróide (médias por grupos)- São Paulo- 2007

Fração de área ocupada por metaplasia condróide			
Grupos	N	média ± desvio padrão	média (%)
Controle	12	0,5 ± 0,6	0,50%
Rottweiler	9	1,6 ± 1,4	1,56%
Pit bull	9	1,6 ± 1,5	1,66%
Labrador	4	2,4 ± 2,4	2,44%
SRD	5	0,3 ± 0,6	0,30%
Raças variadas	6	0,4 ± 0,7	0,40%

N- número de animais no grupo

Gráfico 7- Comparação da média de fração de área ocupada por metaplasia condróide (%) no tecido ligamentar entre os grupos de estudo - São Paulo - 2007

4.4.1.1 *Análise estatística*

Os grupos foram considerados advindos de populações normais pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com nível de significância de 5%. Encontrou-se diferença significativa na distribuição da área de metaplasia nos grupos considerados (teste ANOVA com $p = 0,035$). O gráfico 8 ilustra esta análise estatística.

Os testes de comparações múltiplas (teste de Tukey e teste de Dunnett) sugerem que o Grupo dos Labradores foi significativamente diferente do grupo controle (teste de Dunnett com $p = 0,049$).

Não houve correlação entre a fração de área ocupada por metaplasia condróide e as variáveis: idade, peso, sexo, articulação acometida e tempo de evolução.

Gráfico 8- Análise estatística da fração de área ocupada por metaplasia condróide entre os grupos - São Paulo - 2007

4.4.2 Estudo morfométrico das fibras de colágeno

A fração de área ocupada por fibras de colágeno nos cortes histológicos corados pelo Picrossírius foi significativamente maior no grupo controle.

Nos cortes histológicos do LCCr rompidos houve perda do padrão de organização dos feixes de colágeno. Essa desorganização foi evidenciada com maior ou menor intensidade nos diferentes animais deste grupo.

A fração de área ocupada por fibras de colágeno foi em média 82% para o grupo controle, 55% para a raça Rottweiler, 52% para Labradores e 52% para Pit bulls. No grupo de animais de raças variadas a fração de área ocupada por fibras de colágeno foi em média 68,22% e no grupo dos cães SRD 46,87%. Os valores estão descritos na tabela 4 e ilustrados no gráfico 9.

Tabela 4- Médias da fração de área ocupada por fibras de colágeno entre os grupos - São Paulo- 2007

Fração de área ocupada por fibras de colágeno			
Grupos	N	média $\pm$ desvio padrão	média (%)
Controle	13	0,82 $\pm$ 0,09	82%
Rottweiler	9	0,55 $\pm$ 0,18	55%
Pit bull	8	0,52 $\pm$ 0,24	52%
Labrador	4	0,53 $\pm$ 0,14	52%
SRD	5	0,47 $\pm$ 0,13	46,87%
Raças variadas	9	0,65 $\pm$ 0,12	68,22%

N- número de animais por grupo

Gráfico 9- Comparação da fração de área ocupada por fibras de colágeno no tecido ligamentar (%) entre os grupos de estudo - São Paulo - 2007

4.4.2.1 Análise estatística

O grupo controle obteve a maior média da fração de área ocupada por fibras de colágeno, 82, 31%, diferindo significativamente dos demais grupos que obtiveram médias de 55,27% para os Rottweilers, 52,67% para os Labradores, 52,26% para os Pit bulls, 65,02% para o grupo de raças variadas e 46,75% para os cães SRD.

Considerando nível de significância de 5%, e utilizando testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, foi possível considerar os grupos vindos de populações normais em relação à área ocupada por fibras de colágeno. Foi observada diferença significativa quanto à média de área de colágeno dos grupos (teste ANOVA com $p < 0,001$). O teste de Tukey foi usado para comparar todos os grupos entre si e o teste de Dunnett para comparar cada grupo com o controle. Tanto pelo teste de Tukey como pelo teste de Dunnett, verificou-se que os grupos cirúrgicos diferem significativamente do grupo controle, com exceção do grupo de raças variadas. O grupo controle possui média (82,31%) significativamente maior que dos outros grupos. Os valores de p resultantes desta análise comparativa encontram-se descritos na tabela 5.

Tabela 5– Descrição dos valores de p resultantes da comparação entre o grupo controle e os demais quanto à fração de área ocupada por fibras de colágeno - São Paulo - 2007

GRUPOS	Valor de p pelo Teste de Tukey	Valor de p pelo Teste de Dunnett
Rottweiler	0,003	0,001
Labrador	0,021	0,009
Pit bull	0,001	0,000
Raças variadas	0,130	0,062
SRD	0,001	0,000

Os grupos de cães com LCCr rompidos não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey. Esta análise estatística está representada no gráfico 10. Não houve correlação entre a fração de área ocupada por fibras de colágeno e as variáveis idade, peso, sexo, articulação afetada e tempo de evolução.

Gráfico 10- Análise estatística da área ocupada por fibras de colágeno entre os grupos - São Paulo - 2007

4.4.3 Estudo das fibras do sistema elástico

O grupo controle apresentou média da densidade linear de fibras do sistema elástico de $4756,93 \mu\text{m}^2$. No grupo cirúrgico, a densidade linear de fibras elásticas foi em média $2809,1 \mu\text{m}^2$ no grupo de raças variadas, $5652,38 \mu\text{m}^2$ no grupo de Pit bulls, $6543,45 \mu\text{m}^2$ nos Rottweilers, $7864,7 \mu\text{m}^2$ nos cães SRD e $11250,23 \mu\text{m}^2$ nos Labradores. Os valores estão descritos na tabela 6 e ilustrados no gráfico 11.

Tabela 6- Média da densidade linear das fibras do sistema elástico nos grupos- São Paulo- 2007

Densidade linear das fibras do sistema elástico (μm^2)		
Grupos	N	média $\pm$ desvio padrão
Controle	12	$4756,9 \pm 1998,6$
Rottweiler	9	$6543,5 \pm 4522,9$
Pit bull	5	$5652,4 \pm 9541,1$
Labrador	4	$11250,2 \pm 11390,7$
SRD	3	$7864,7 \pm 4433,5$
Raças variadas	8	$2809,1 \pm 1659,2$

N- número de animais por grupo

Gráfico 11- Comparação da densidade linear de fibras do sistema elástico no tecido ligamentar entre os grupos de estudo - São Paulo - 2007

4.4.3.1 *Análise estatística*

Os cortes do grupo controle examinados indicaram uma quantidade menor dessas fibras do que os cortes obtidos de LCCrs rompidos. No entanto, não houve diferença significativa na distribuição da densidade linear de fibra elástica entre os grupos ($p = 0,074$).

Para a análise estatística das fibras do sistema elástico (Gráfico 12) foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, uma vez que os grupos Labrador e Pit bull não foram considerados vindos de uma população normal pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk (considerando nível de significância de 5%).

Nos grupos de cães com RLCCr os valores para densidade linear de fibras do sistema elástico diminuíram quando houve aumento da idade indicando uma correlação significativa (coeficiente de correlação de Spearman= -0,505 e $p = 0,005$). Também houve correlação negativa significativa entre a densidade linear de fibras do sistema elástico e a fração de área ocupada por fibras de colágeno. A fração de área ocupada por fibras de colágeno diminuiu no sentido em que a densidade linear

de fibras do sistema elástico aumentou (coeficiente de correlação de Spearman= - 0,426 e $p=0,027$).

Gráfico 12- Análise estatística de densidade linear de fibras do sistema elástico - São Paulo - 2007

4.4.4 Estudo de proteoglicanas

Os cortes histológicos dos animais do grupo controle e do grupo cirúrgico foram corados pelo Alcian Blue-PAS (AB-PAS) para estudo de proteoglicanas.

No grupo controle (Figura 9 A), a análise dos cortes de LCCr íntegros corados pelo A-B indicou que as proteoglicanas (coradas em azul) concentram-se principalmente nas regiões com maior densidade celular, e entre os feixes de colágeno. Nos ligamentos rompidos do grupo cirúrgico os cortes mostram uma ampla distribuição de regiões coradas em azul e, ao contrário do observado no grupo controle, estas regiões não estão confinadas às áreas de tecido localizadas entre os feixes de colágeno, mas disseminadas por todo o corte uma vez que estes feixes encontram-se desorganizados. Nas áreas de metaplasia condróide a região pericelular mostra forte coloração azul indicando a presença de proteoglicanas na substância fundamental amorfa (Figura 9 B).

Figura 9- Fotomicrografia do LCCr em corte longitudinal;A- Cão Nº 40. No LCCr íntegro as proteoglicanas coradas em azul concentram-se principalmente entre os feixes de colágeno (*); B- Cão Nº 25. Os LCCr rompidos mostraram-se fortemente corados em azul, especialmente nas regiões pericelulares (seta). AB-PAS; 20X.

A fração de área ocupada por proteoglicanas correspondeu a 5,55% nos cortes de LCCr rompido, considerando-se todas as raças num único grupo cirúrgico, e 5,81% nos cortes do grupo controle (Tabela 7, Gráfico 13).

Tabela 7 - Médias da fração de área ocupada por proteoglicanas - São Paulo- 2007

Fração de área ocupada por proteoglicanas			
Grupos	N	média ± desvio padrão	média (%)
Controle	11	0,0581 ± 0,0422	5,81%
Rottweiler	8	0,0845 ± 0,0598	8,45%
Pit bull	8	0,0790 ± 0,0606	7,90%
Labrador	3	0,0361 ± 0,0217	3,61%
SRD	4	0,0336 ± 0,0323	3,36%
Raças variadas	10	0,0274 ± 0,0327	2,74%

N= número de animais do grupo; média= média do grupo

Gráfico 13- Comparação da fração de área ocupada por proteoglicanas no tecido ligamentar entre os grupos de estudo - São Paulo - 2007

4.4.4.1 Análise estatística

Não foi encontrada diferença significativa entre o grupo cirúrgico e controle. Quando os sub-grupos foram comparados dois a dois, houve diferença significativa entre o grupo formado por cães de raças variadas e os grupos de Rottweilers e Pit bulls. Houve correlação negativa significativa entre a fração de área ocupada por fibras de colágeno e a fração de área ocupada por proteoglicanas (coeficiente de correlação de Spearman = -0,406 e $p=0,024$). O gráfico 14 ilustra a análise estatística entre os grupos.

Gráfico 14- Análise estatística da fração de área ocupada por proteoglicanas - São Paulo - 2007

4.5 ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL

Um estudo qualitativo descritivo da ultra-estrutura do LCCr foi realizado por microscopia eletrônica de transmissão nas amostras de ligamento de dois cães do grupo cirúrgico e um do grupo controle.

A análise das amostras do grupo controle revela a organização típica dos tecidos ligamentares. Os fibroblastos aparecem como células fusiformes de núcleo alongado, com processos citoplasmáticos dispostos entre os feixes de fibras de colágeno (Figura 10 A). Seu citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e a presença de diversas vesículas secretoras revelam sua atividade sintética. A região pericelular é preenchida por substância fundamental amorfa, separando a célula dos feixes de fibrilas colágenas (Figura 10 B). Os feixes de fibrilas em corte longitudinal apresentam-se como faixas claras e escuras alternadas subdivididas por delicadas estriações transversais, caracterizando o colágeno tipo I (Figura 10 C). Em corte transversal essas fibrilas aparecem como estruturas circulares de diâmetros variáveis agrupadas em diferentes feixes (Figura 10 D).

Figura 10– Cão N° 53. Fotomicrografia eletrônica de LCCr íntegro. A- Fibroblasto (F) entre feixes de colágeno em cortes transversais (*) e longitudinais (**); B e C- Porção de um fibroblasto evidenciando citoplasma rico em RER (seta azul) e vesículas (seta branca), fibrilas de colágeno exibindo faixas claras e escuras alternadamente (detalhe). D- MEC evidenciando fibrilas de colágeno de diferentes diâmetros organizadas em feixes, fibras do sistema elástico (*).

Nos ligamentos rompidos (Figura 11) foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão, células com formato mais alongado semelhante a fibroblasto (Figura 11 A) e células semelhantes a condrócitos (Figura 11 B). Concentramos a análise nas regiões de ocorrência de metaplasia condróide. Nessas regiões, tanto a matriz como as células caracterizam um tecido fibrocartilaginoso. As células apresentam particularidades típicas de condroblasto, como núcleo arredondado e com localização excêntrica, citoplasma rico em REG (Figura 11 B).

Ao redor da célula observa-se uma região mais clara, provavelmente composta por colágeno tipo II (Figura 11 C). Na matriz extracelular nestas regiões, o colágeno tipo I não mostra a organização típica dos ligamentos íntegros, nestes casos o colágeno não está organizado em feixes de fibrilas dispostos paralelamente. Pequenos feixes podem aparecer entre fibrilas de colágeno que estão dispostas em todas as direções (Figura 11 D). Observou-se a presença de fibrilas de diferentes diâmetros compondo os feixes de colágeno. A presença de fibrilas finas e grossas dentro de um mesmo feixe promove o aspecto desorganizado do tecido.

Figura 11 – Fotomicrografia eletrônica de LCCr rompido. A-Cão Nº 10. Ffibroblasto alongado (F); B-Cão Nº 10. Célula semelhante a condrócito, com núcleo (N) excêntrico. A MEC apresenta-se desorganizada e observam-se fibrilas de colágeno de diferentes diâmetros dentro de um mesmo feixe (A- detalhe); C e D- Cão Nº 17. A região pericelular mostra fibrilas de colágeno desorganizadas e de tamanhos diferentes (setas) e apresenta uma região com características de colágeno tipo II (*).

A presença de grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso no citoplasma destas células indica uma intensa atividade de síntese de material extracelular, isto ocorre em situações de crescimento e reparo de lesões. No caso dos fragmentos de LCCr estudados, a presença de células semelhantes a condrócitos revela a possibilidade de formação de fibrocartilagem nesse material.

4.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Para a realização dos testes imuno-histoquímicos foram selecionados 13 animais do grupo cirúrgico (5 Rottweilers, 5 Pit bulls e 3 Labradores) e 7 animais do grupo controle.

4.6.1 Análise da imuno-histoquímica para α -actina de músculo liso

A expressão de α -actina de músculo liso nos cortes teciduais de LCCr foi realizada utilizando-se o anticorpo policlonal anti- α -actina de músculo liso.

O anticorpo α -actina de músculo liso marca em castanho principalmente o citoplasma. Foram observadas células positivas para α -actina tanto no grupo cirúrgico quanto no grupo controle. Algumas células marcadas exibiram aparência condrocítica e algumas exibiram aparência de miofibroblastos (Figuras 12 A e 12B).

Figura 12- Fotomicrografia do LCCr com marcação positiva para α -actina de músculo liso (setas).
A- Cão nº 51, LCCr íntegro em corte longitudinal; B- Cão nº 18, LCCr rompido em corte longitudinal.

Um estudo quantitativo das células marcadas pela α -actina de músculo liso revelou uma média de 15 células marcadas numa área média de $13640,38 \mu\text{m}^2$ no grupo de LCCr rompido, enquanto nos animais controle a média foi de 5 células marcadas para uma área média de $14296,43 \mu\text{m}^2$.

As médias da área necessária para identificar uma célula marcada por α -actina de músculo liso estão resumidas na tabela 8 e ilustradas no gráfico 15.

Tabela 8 – Distribuição das médias de área necessária para observação de 1 célula marcada para α -actina de músculo liso - São Paulo - 2007

Média da área (μm^2) necessária para localizar 1 célula marcada por α -actina de músculo liso		
Grupos	N	média $\pm$ desvio padrão
Controle	7	6362,183 $\pm$ 6153,672
Rottweiler	5	1354,841 $\pm$ 705,582
Pit bull	5	1337,264 $\pm$ 1126,462
Labrador	3	1257,188 $\pm$ 704,328

N- número de animais do grupo; média= média do grupo

Gráfico 15- Comparação entre os grupos da média da área (μm^2) necessária para identificação de uma célula marcada por α - actina de músculo liso - São Paulo - 2007

4.6.1.1 Análise estatística

Quando comparamos pelo teste estatístico de Mann-Whitney, o grupo controle com o grupo cirúrgico, a análise estatística dos dados obtidos com a análise das amostras revelou que a ocorrência de células marcadas por α -actina foi significativamente maior nos LCCr rompidos ($p=0,022$), no entanto comparando-se cada raça separadamente com o grupo controle não houve diferença estatisticamente significativa.

Na análise de correlação no grupo cirúrgico houve correlação significativa positiva entre a fração de área ocupada por fibras de colágeno e a expressão de α -actina de músculo liso (coeficiente de correlação de Spearman=0,593 e $p=0,030$). O gráfico 16 ilustra a análise estatística.

Gráfico 16- Análise estatística da média da área necessária para identificação de uma célula marcada por α -actina de músculo liso - São Paulo – 2007

4.6.2 Análise da Caspase-3

A expressão de Caspase-3 ativada nos cortes teciduais de LCCr foi realizada utilizando-se o anticorpo policlonal anti- caspase 3 ativada.

O anticorpo Caspase-3 marca a célula em castanho. A marcação indica células em diferentes estágios de apoptose (Figuras 13A e 13B).

Figura 13- Fotomicrografia do LCCr com marcação positiva para Caspase-3 (setas). A- Cão nº 50, LCCr íntegro em corte longitudinal; B- Cão nº 10, LCCr rompido em corte longitudinal.

Nos cortes de LCCr rompido as células caspase positivas foram observadas preferencialmente nas regiões onde os feixes de colágeno mostraram-se desorganizados, mas também foram observadas células positivas nas áreas adjacentes. Observou-se células marcadas tanto na região central do LCCr quanto na área epiligamentar. A marcação positiva ocorreu tanto nas células com aspecto condróide, quanto em fibroblastos de aparência fusiforme.

Quando comparamos o grupo controle com o grupo cirúrgico, a análise das amostras revelou que a atividade da Caspase 3 foi maior nos LCCr rompidos. Para encontrar uma célula positiva para caspase 3 foi necessária uma área média de $14298,81\mu\text{m}^2$ nos cortes de LCCr rompido e de $2697,62\mu\text{m}^2$ nos cortes de LCCr íntegro (Tabela 9, Gráfico 17).

O estudo quantitativo das células marcadas pela caspase-3 revelou, numa área média de $21166,67\mu\text{m}^2$, uma média de 13 células marcadas no grupo de LCCr

rompido, enquanto os animais controle a média foi de 3 células marcadas para uma área média de 22500 μm^2 .

Tabela 9 – Distribuição da média de área necessária para observação de 1 célula marcada para Caspase 3 ativada - São Paulo- 2007

Média da área (μm^2) necessária para localizar uma célula marcada por caspase 3		
Grupos	N	média $\pm$ desvio padrão
Controle	7	14298,809 $\pm$ 10352,457
Rottweiler	5	3535,238 $\pm$ 2280,407
Pit bull	5	2016,905 $\pm$ 1171,582
Labrador	3	2540,741 $\pm$ 1459,635

N= número de animais do grupo; média= média do grupo

Gráfico 17- Comparação entre os grupos da média da área (μm^2) necessária para identificação de uma célula marcada por α - actina de músculo liso - São Paulo – 2007

4.6.2.1 Análise estatística

O teste estatístico de Mann-Whitney foi utilizado para analisar os dados da Caspase- 3. Quando cotejamos o grupo controle com o grupo cirúrgico, a análise estatística dos dados obtidos com a análise das amostras revelou que a atividade da Caspase- 3 foi significativamente maior nos LCCr rompidos ($p=0,014$), no entanto comparando-se cada raça separadamente com o grupo controle houve diferença estatisticamente significativa entre os Pit bulls e o grupo controle ($p= 0,018$). A análise estatística de correlação indicou haver correlação positiva significativa apenas no grupo controle, entre a expressão de Caspase 3 e α -actina de músculo liso (coeficiente de correlação=0,926 e $p=0,008$). O gráfico 18 ilustra a análise estatística.

Gráfico 18- Análise estatística da média da área necessária para identificação de uma célula marcada por Caspase 3- São Paulo- 2007

As tabelas numeradas de 10 a 15 no apêndice B complementam a descrição dos resultados morfométricos deste trabalho, detalhando os valores dentro de cada grupo considerado.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A RLCCr é uma das doenças ortopédicas mais freqüentes no cão (VASSEUR et al., 1985; HARASEN, 2003; HAYASHI et al., 2003). Muitos fatores poderiam levar à RLCCr seguida do desenvolvimento de osteoartrite (JOHNSON; JOHNSON, 1993), diversas investigações, bem como a nossa pesquisa, foram conduzidas no sentido de esclarecer a patogenia da RLCCr.

A predisposição racial parece ser uma influência na ocorrência da RLCCr em cães, mas não um fator determinante da doença, já que não é exclusiva das raças ditas predispostas. A questão racial deve ser considerada durante a investigação clínica, mas a exclusão do diagnóstico de RLCCr em função da não predisposição de determinada raça deve ser cautelosa. Mesmo os cães de raças de pequeno porte e os cães sem raça definida são passíveis de RLCCr ainda que simultânea a outras doenças articulares ou em consequência dessas doenças. A questão racial é amplamente discutida na literatura e os relatos epidemiológicos da ocorrência da RLCCr variam em função do local de origem dos dados. Determinadas raças são mais ou menos freqüentes dependendo da localização do hospital ou clínica veterinária de onde se originam os dados. Além disso, a criação de algumas raças, e conseqüentemente o aumento da sua freqüência nos atendimentos clínico-cirúrgicos, podem variar em diferentes cidades, países e épocas.

Para o presente trabalho foi realizada uma revisão dos casos atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais, HOVET/FMVZ/USP, nos anos de 2004, 2005 e 2006, período no qual o material de estudo deste trabalho foi coletado. Neste período, 293 cães com diagnóstico de RLCC foram atendidos. Esse número corresponde a 2,84% de todos os atendimentos, incluindo não só as afecções ortopédicas, mas também todas as demais patologias passíveis de tratamento cirúrgico.

Na literatura, os dados epidemiológicos da ocorrência de RLCCr em cães apontam para a predisposição de raças como Mastiff, Akita, São Bernardo, Rottweiler, Labrador, American Staffordshire Terrier, Boxer, Poodle, Husky Siberiano, Newfoundlands (SCAVELLI et al., 1990; WHITEHAIR; WILLITS; VASSEUR, 1993).

De acordo com os dados do HOVET/FMVZ/USP, a maior prevalência de RLCCr no período analisado (2004 a 2006) ocorreu na raças Flat Coated Retriever e Dogue de Bordeaux, que obtiveram 100% de RLCCr. No entanto esse valor corresponde a um caso de RLCCr em um único animal atendido no HOVET em 3 anos. Essas raças, assim como Bulldog francês e American Staffordshire Terrier que obtiveram 50% de RLCCr, não são raças freqüentes na rotina de atendimento do HOVET, pois quando comparadas com o total de atendimentos corresponderam a menos de 0,1% desse total.

As raças Rottweiler e Labrador, que frequentemente aparecem nos relatos epidemiológicos da literatura (SCAVELLI et al., 1990; WHITEHAIR; WILLITS; VASSEUR, 1993; HARASEN, 2003; TATARUNAS, 2004) como algumas das raças mais predispostas à RLCCr, também apresentaram alta frequência de RLCCr na nossa análise. E também foram duas das principais raças que possibilitaram a coleta de material durante a intervenção cirúrgica. Além dessas raças, os Pit bulls representaram o terceiro grupo formado para análise do material coletado.

Essa diferença entre os grupos formados para o estudo das características teciduais e as raças acometidas de RLCCr na análise epidemiológica dos dados do HOVET aconteceu em função da ocorrência ou não de intervenção cirúrgica por artroscopia desses animais. A determinação das raças mais acometidas pela RLCCr foi realizada a partir do diagnóstico ou suspeita clínica no primeiro atendimento e não em função do retorno do animal para intervenção cirúrgica.

Os Pit bulls não são vistos com freqüência em relatos epidemiológicos internacionais, no entanto, no Brasil a criação de cães desta raça ocorre com grande freqüência, revelando que as análises epidemiológicas são influenciadas também por modismo em determinadas épocas. No HOVET, entre 2004 e 2006 foram atendidos 260 cães desta raça no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais correspondendo a 2,52% do total de cães atendidos. No entanto, dos 260 Pit bulls atendidos, 44 (16,92%) tinham diagnóstico de RLCCr. Essa proporção para os Pit bulls foi bastante superior à das demais raças aqui estudadas e ocupa a 8ª posição na classificação de todas as raças com RLCCr, à frente dos Rottweilers e Labradores.

A frequência com que os cães das raças Rottweiler, Pit bull e Labrador foram submetidos à intervenção cirúrgica para tratamento da RLCCr possibilitou a

obtenção de amostras de LCCr rompido e resultou na formação dos subgrupos estudados neste trabalho. Estes subgrupos juntamente com os cães SRD e cães de raças variadas formaram o grupo cirúrgico. As análises dos resultados procuraram traçar parâmetros de comparação entre o grupo cirúrgico e o grupo controle e também entre os subgrupos de raças.

A hipótese de haver uma correlação entre os achados histopatológicos e o histórico dos animais foi testada estatisticamente e algumas correlações foram encontradas.

Para determinar o tempo de evolução da doença, consideramos como início a data fornecida pelo proprietário para o aparecimento dos sintomas e como término a data da cirurgia. Esse período variou imensamente, de 1 a 18 meses. Esse tempo de evolução pode ser questionável, já que a informação nem sempre é precisa. É necessário considerar a possibilidade do proprietário não ter notado os sintomas logo no início da doença, principalmente em cães de raças grandes que muitas vezes são criados na área externa das casas não tendo uma grande proximidade com as pessoas, ao contrário do que acontece com os cães pequenos.

O tempo de evolução foi maior nos cães mais pesados. Sendo assim, o peso é um fator relevante na ocorrência da RLCCr e que apresenta uma correlação negativa com a idade dos animais.

Como no trabalho de Whitehair, Willits e Vasseur (1993), nosso estudo revelou que nos cães mais pesados a ocorrência de RLCCr se dá em animais mais jovens, enquanto nas raças pequenas e de menor peso corpóreo, a RLCCr foi diagnosticada numa idade mais avançada. Esse fato pode apoiar a hipótese de que a sobrecarga de peso poderia ser responsável por mudanças estruturais do ligamento, levando à ruptura. Já em cães de raças pequenas, a RLCCr estaria associada a outras patologias e portanto aconteceria em consequência de uma desestabilização da articulação, sobrecarregando assim o ligamento. Em cães de raças pequenas atendidos no HOVET o diagnóstico de RLCCr foi frequentemente associado a outras patologias articulares como a luxação de patela. Um exemplo dessa situação foi o cão da raça poodle (cão nº 32), que foi submetido a dois procedimentos cirúrgicos para tratamento de RLCCr (joelho direito e esquerdo) e de luxação medial de patela.

A idade também pode ser correlacionada com características estruturais do ligamento, como a densidade linear de fibras do sistema elástico.

Nos grupos de cães com RLCCr os valores para densidade linear de fibras do sistema elástico diminuíram quando houve aumento da idade indicando uma correlação significativa. Sargon et al. (2004) ao investigarem a estrutura do ligamento cruzado posterior em humanos, que é a estrutura equivalente ao ligamento cruzado caudal dos cães, verificaram que nos jovens houve uma presença maior de fibras oxitalânicas entre os feixes de fibra colágena e variabilidade no diâmetro das fibras, mas não observaram diferenças nas fibras do sistema colágeno nas diferentes faixas etárias, da mesma forma que em nosso estudo também não foi encontrada uma correlação das fibras de colágeno e a idade dos animais.

A fração de área ocupada por fibras de colágeno diminuiu no sentido em que a densidade linear de fibras do sistema elástico aumentou. Uma explicação para esta correlação pode ser o fato das fibras do sistema elástico encontrarem-se dispostas entre os feixes de colágeno. A desorganização e diminuição da concentração dos feixes de colágeno poderiam deixar as fibras do sistema elástico mais visíveis.

Não houve correlação estatística entre a fração de área ocupada por metaplasia condróide e as variáveis: idade, peso, sexo, articulação acometida e tempo de evolução. Hayashi et al. (2004) também não encontraram relação das mudanças adaptativas ou degenerativas com essas variáveis e sugeriram que as mudanças celulares e da MEC poderiam decorrer de fatores como sobrecarga mecânica, microlesão do ligamento, isquemia ou inflamação. Em nosso estudo não foram encontradas áreas inflamatórias nos cortes de LCCr.

Os Labradores apresentaram uma área maior ocupada por metaplasia condróide, quando comparada com a do grupo controle. Na literatura (COMERFORD et al., 2005) a raça Labrador aparece como uma raça predisposta e foi comparada com cães da raça Greyhound considerados não predispostos à RLCCr. Segundo estes autores as mudanças teciduais no LCCr como a formação de fibrocartilagem, nos Greyhounds deve-se à adaptação fisiológica à corrida e não a um processo degenerativo como nos Labradores. Esta adaptação à corrida também foi o motivo do aumento do diâmetro das fibras de colágeno dos Greyhounds relatado pelo mesmo autor em 2006 analisando o material por microscopia eletrônica de transmissão.

Embora a análise macroscópica mostrasse a integridade do LCCr nos cães do grupo controle, a área ocupada por alterações correspondeu a 0,5%, sugerindo que

esse tipo de alteração tecidual pode estar presente antes da ruptura caso ela venha a acontecer neste animal.

Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e eles são capazes de modular sua capacidade metabólica, a qual vai se refletir na sua morfologia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A alteração observada na morfologia das células do ligamento rompido onde assumiram a forma de condrócitos pôde ser também observada na análise da ultra-estrutura. A microscopia eletrônica de transmissão sugeriu a presença de colágeno tipo II, o mesmo tipo encontrado em cortes de cartilagem, e que é sintetizado pelos condroblastos (MONTES; JUNQUEIRA, 1982) circundando algumas células nos corte de LCCr rompido.

Durante a cirurgia para tratamento da RLCCr e estabilização da articulação do joelho, os resquícios de LCCr rompidos são retirados e a cartilagem articular é minuciosamente examinada. Nos animais dos quais o material deste trabalho foi retirado, não havia a presença de fragmentos livres da cartilagem articular. Vale ressaltar esta informação devido ao fato de terem sido encontradas nas amostras de LCCr rompido, células semelhantes a condrócitos o que poderia levar a um entendimento de que o fragmento de cartilagem solto foi envolto por tecido ligamentar. No entanto a ausência desses fragmentos dentro da articulação leva a pensar que uma modificação de fibroblastos em células semelhantes a condrócitos está sendo observada.

A análise histológica e ultra-estrutural revelou que nos ligamentos rompidos aparecem áreas de metaplasia condróide, ou seja, áreas onde o típico tecido ligamentar encontra-se substituído por tecido semelhante a fibrocartilagem. A fibrocartilagem ocorre em regiões onde há necessidade de resistência à compressão e ao cisalhamento, o que sugere duas hipóteses:

a) a conformação articular levaria a uma compressão do ligamento que, como sendo um tecido plástico, pode se modificar devido a necessidade de resistência a compressão;

b) a ruptura induz a uma compressão dos fragmentos de ligamento levando a uma metaplasia deste tecido.

A primeira hipótese é mais aceitável uma vez que em animais do grupo controle é possível encontrar pequenas áreas de metaplasia.

Os tendões e os ligamentos são compostos predominantemente por colágeno, que é a proteína mais abundante do organismo. O colágeno é capaz de suportar altas forças de tensão, isto é, o colágeno resiste ao estiramento. No tecido conjuntivo denso modelado as fibras são altamente polimerizadas, muito unidas e ordenadas de forma orientada, em resposta às forças de tensão exercidas sobre elas (BANKS, 1992). A desorganização das fibras da matriz extracelular parece decorrer da ruptura do ligamento uma vez que as forças de tensão que orientam o modelamento do tecido estão ausentes.

A capacidade de cicatrização e regeneração do ligamento cruzado é limitada por tratar-se de um tecido constituído principalmente de matriz extracelular e com suprimento vascular reduzido o que diminui a possibilidade de ocorrer uma resposta inflamatória e a formação de uma cicatriz intermediária.

O envelope sinovial torna os ligamentos cruzados como estruturas extra-sinoviais, protegidos dos efeitos de degradação do ambiente sinovial embora eles sejam considerados intra-articulares (DE ROOSTER et al., 2006). O recobrimento sinovial não ocorre nas superfícies de contato direto com o outro ligamento cruzado. Sendo assim, o ligamento nessa região de contato, seria uma estrutura localizada em ambiente articular em contato direto com o líquido sinovial, que é rico em enzimas proteolíticas.

O reparo não acontece nos LCCr de cães e um dos motivos pode ser a pouca vascularização (VASSEUR, 1993), principalmente na região central do ligamento onde se dá a ruptura. O material analisado neste trabalho evidenciou a rara presença de vasos sanguíneos nos cortes de LCCr, exceto por aqueles presentes no tecido sinovial que recobre o ligamento. A análise dos cortes histológicos não indicou a presença de células inflamatórias. Células com características de condrócito foram marcadas por imuno-histoquímica pela α -actina de músculo liso e poderiam ser identificadas como condroblastos. Também havia células marcadas com semelhança a miofibroblastos. A presença destes tipos celulares no lugar dos fibroblastos característicos do LCCr talvez possa indicar o trabalho da célula para a recuperação da lesão. No entanto essa recuperação não acontece e as bordas rompidas são envolvidas pelo tecido sinovial que recobre o ligamento. Esse tecido sinovial é a membrana sinovial que envolve o ligamento.

Algumas células do tecido conjuntivo conhecidas como miofibroblastos pode, em resposta a mudanças nas condições físicas e químicas do ambiente celular, expressar o gene que codifica uma isoforma contrátil de α -actina (MURRAY et al., 2000). A expressão desse gene está correlacionada com o comportamento contrátil das células. Os miofibroblastos são células de aspecto alongado cuja identificação não é possível em preparados corados com HE. A identificação dos miofibroblastos pode ser realizada por microscopia eletrônica de transmissão e imuno-histoquímica para α -actina de músculo liso. Estas células estão associadas a reparação de lesões.

Em 2001, Murray et al., estudando a expressão de α -actina de músculo liso no LCCr, concluíram que o LCCr do cão é o que apresenta, entre as espécies domésticas, a maior semelhança com o dos humanos, o que justifica o grande número de trabalhos que utilizam o cão como modelo experimental para estudo de OA em humanos (ORFORD et al., 1983; STOCKWELL et al., 1983; KOBAYASHI et al., 1997; PANULA et al., 1998; LORENZ et al., 2004).

A identificação dos miofibroblastos pode ser realizada por microscopia eletrônica de transmissão e imuno-histoquímica para α -actina de músculo liso. Estas células estão associadas com a reparação de lesões, participando do fechamento da lesão uma vez que possuem capacidade contrátil devido a presença de actina em seu citoesqueleto. Acredita-se que os miofibroblastos são fibroblastos modificados que surgem em resposta a estímulos decorrentes de lesão dos tecidos. Considerando a participação destas células no reparo e cicatrização, Murray et al. (2000), investigaram se existem diferenças na população de miofibroblastos nos ligamento rompidos e íntegros. Não houve diferença, assim como nas amostras analisadas em nosso trabalho, reforçando o conceito de que mecanismos de reparo e cicatrização em ligamentos são muito reduzidos.

A técnica imuno-histoquímica para α -actina de músculo liso também permitiu verificar a presença de marcação positiva em células semelhantes à condrócitos. Em 2000, Kim e Spector, estudaram a distribuição de condrócitos na cartilagem articular humana, estes foram marcados pelo anticorpo α -actina de músculo liso utilizando essa técnica de imuno-histoquímica.

As alterações encontradas no LCCr parecem ser derivadas de mudanças na forças de tensão aplicadas ao tecido, o que levaria a remodelação do mesmo.

Alguns autores consideram possível que esse remodelamento aconteça como uma resposta fisiológica em determinadas raças e como uma alteração patológica em outras (COMERFORD et al., 2006). No entanto, o material analisado mostra que mesmo dentro de um mesmo grupo racial podem ocorrer diferenças grandes entre indivíduos no que diz respeito à área tecidual modificada.

Trabalhos anteriores (AMIEL et al., 1984; MURRAY et al., 2004) com ligamentos íntegros de humanos e ovinos, indicaram que a presença de miofibroblastos é comum nesses ligamentos sugerindo que a presença dessas células tenha um papel na manutenção do padrão de *crimp* da matriz extracelular.

Assim como Murray et al. (2000) evidenciou em seu trabalho com LCCr humanos, em nosso estudo verificamos a ocorrência de células marcadas por α -actina de músculo liso também nos ligamentos íntegros, porém a diferença entre o grupo cirúrgico e o grupo controle foi significativa.

Nas amostras estudadas, foram encontradas células marcadas pela Caspase 3 tanto na região central do ligamento quanto na região epiligamentar. Hayashi et al. (2003), descreveram a presença de células em apoptose na região epiligamentar.

Assim como Gyger et al. (2006), este estudo também observou um maior número de células em apoptose nos LCCr rompidos quando comparados com as amostras de LCCr íntegros do grupo controle. Para Gyger et al. (2006) o aumento destas células em apoptose teria um papel na ruptura do LCCr. No entanto, verificamos a presença de células em processo de apoptose tanto em LCCr rompidos quanto nos íntegros, e esse resultado não seria suficiente para designar a apoptose como um fator de causa da RLCCr, embora tenha havido diferença estatística entre o grupo cirúrgico e o grupo controle, já que a apoptose é um tipo de morte celular que pode ocorrer tanto em situações patológicas como fisiológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual. Sendo assim, pode-se sugerir, que a presença de células apoptóticas nas amostras de LCCr pode ser um processo fisiológico de remodelamento e renovação que estivesse acontecendo antes da RLCCr, como também pode ser posterior à ruptura, no sentido de remover as células lesadas.

Em contraste com o colágeno, as glicosaminoglicanas (GAG) representam uma fração menor da matriz extracelular em tendões e ligamentos. Encontramos uma correlação negativa significativa entre a fração de área ocupada por colágeno e a

fração de área ocupada por proteoglicanas. Entretanto as GAGs são essenciais para o funcionamento correto e reparo nesses tecidos, influenciando a migração celular, a diferenciação celular e exercendo um papel regulador na síntese de colágeno e em seu arranjo tridimensional.

As proteoglicanas estão intimamente associadas com as fibras de colágeno e podem ter uma função na morfogênese do tecido com colágeno, na manutenção deste tecido em ambas as situações (HASSELL; KIMURA; HASCALL, 1986). Quando da presença de degeneração desse tecido, pode ocorrer a destruição dessas proteoglicanas, traduzida em grandes áreas de concentração da coloração azul, o que não acontece no tecido normal. A utilização do método de coloração pelo A-B visa identificar áreas que estejam sofrendo processo de desagregação, não visíveis na coloração de Picrossírius (BARROCO; LEMOS; NERY, 1998).

Diferença entre a distribuição de proteoglicanas podem indicar diferenças nas necessidades metabólicas e funcionais de um tecido. Concentrações maiores de GAGs indicam uma maior quantidade de água associada, o que altera as propriedades viscoelásticas do tecido. Nos ligamentos isto confere uma capacidade maior de absorção de choque (BENJAMIN; RALPHS, 1998).

A variação na aparência das células encontradas no LCCr pode refletir uma diferença com relação ao tipo de força (tensão ou compressão) que age nas diferentes regiões do ligamento.

O comportamento dinâmico que os tendões e ligamentos apresentam, sugere que as suas células são capazes de, detectando mudanças na carga e coordenando sua resposta, alterar a composição da matriz extracelular. Uma das maneiras em que a MEC dos tendões e ligamentos é modificada em resposta a carga, é pela formação de matriz fibrocartilaginosa nos locais onde o tendão ou ligamento está sob compressão (BENJAMIN; RALPHS, 1998).

Não verificamos diferenças quantitativas significantes em relação à área ocupada por proteoglicanas entre os cortes de LCCr rompido e íntegro. No entanto observou-se uma diferença em relação à localização dessas áreas. As regiões ocupadas por metaplasia condróide foram associadas com a presença de proteoglicanas e uma área pericelular dessas células com aparência condróide foram fortemente coradas em azul pelo Alcian-blue.

Um aumento na concentração de glicosaminoglicanas seria esperado num processo de reparo tecidual, no entanto a diferença encontrada entre essa concentração nos cortes histológicos de LCCr rompido e íntegro não foi significativa, reforçando a idéia de que um reparo tecidual no LCCr rompido está ausente.

A causa da degradação que leva à RLCCr em cães é constantemente questionada nos diversos artigos que tratam do assunto. Diferentes créditos têm sido atribuídos a este fato: microtraumas frequentes enfraquecem a estrutura do ligamento culminando na sua ruptura (COMERFORD et al., 2005); a ocorrência de um processo inflamatório que inicie uma resposta mediada por enzimas degradadoras de matriz que atuem levando ao enfraquecimento e posterior ruptura do ligamento (GALLOWAY; LESTER, 1995; VASSEUR, 1985); alterações na matriz extracelular e componente celular que precedem a RLCCr (HAYASHI et al., 2003).

Assim sendo, com base na análise histopatológica dos fragmentos de LCCr estudados, acreditamos que a RLCCr possa ser decorrente de uma degradação gradual das subunidades que constituem o tecido ligamentar (matriz extracelular fibrosa, substância amorfa e componente celular).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Ao finalizar este projeto podemos concluir que:

- ◆ Há uma predisposição racial na ocorrência de RLCCr.
- ◆ O peso é um fator relevante na ocorrência da RLCCr.
- ◆ O LCCr íntegro apresenta áreas ocupadas por tecido característico do tecido conjuntivo denso modelado, porém também pode apresentar áreas ocupadas por tecido alterado por metaplasia condróide.
- ◆ Não há relação entre metaplasia condróide e o tempo de evolução da doença articular.
- ◆ O LCCr rompido apresenta diminuição na área ocupada por fibras de colágeno em relação ao íntegro e estas fibras mostram-se desorganizadas.
- ◆ A densidade linear de fibras do sistema elástico aumenta no sentido em que a área ocupada por colágeno diminui.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AMIEL, D.; FRANK, C.; HARWOOD, F.; FRONEK, J.; AKESON, W. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. **Journal of Orthopaedic Research**, v.1, p. 257-265, 1984.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1992.
- BARROCO, R. S.; LEMOS, M.; NERY, C. A. S. Pé plano adquirido do adulto por disfunção do tendão do tibial posterior: avaliação clínica, imagenológica e morfométrica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.33, n.7, p.563-576, 1998.
- BENJAMIN, M.; RALPHS, J. R. Fibrocartilage in tendons and ligaments-an adaptation to compressive load. **Journal of Anatomy**, v. 193, p. 481-494, 1998.
- CAMPBELL, W. C. Repair of the ligaments of the knee. Report a new operation for rapair of the anterior cruciate ligament. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, v. 62, p. 964-968, 1936.
- COMERFORD, E. J.; TARLTON, J. F.; INNES, J. F.; JOHNSON, K. A.; AMIS, A. A.; BAILEY, A. J. Metabolism and composition of the canine anterior cruciate ligament relate to differences in knee joint mechanics and predisposition to ligament rupture. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, p. 61-66, 2005.
- COMERFORD, E. J.; TARLTON, J. F.; WALES, A.; BAILEY, A. J.; INNES, J. F. Ultrastructural differences in cranial cruciate ligaments from dogs of two breedes with a differing predisposition to ligament degeneration and rupture. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, p. 8-16, 2006.
- DE ROOSTER, H.; COX, E.; VAN BREE, H. Prevalence and relevance of antibodies to type- I and type-II collagen in synovial fluid of dogs with cranial cruciate ligament damage. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 11, p. 1456-1461, 2000.
- DE ROOSTER, H.; DE BRUIN, T.; VAN BREE, H. Morphologic and functional features of the canine cruciate ligaments. **Veterinary Surgery**, v. 35, p. 769-780, 2006.
- DUVAL, J. M.; BUDSBERG, S. C.; FLO, G. L.; SAMMARCO, J. L. Breed, sex, and body weight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 6, p. 811-813, 1999.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara, 1990.

GALLOWAY, R. H.; LESTER, S. J. Histopathological evaluation of canine stifle joint synovial membrane collected at the time of repair of cranial cruciate ligament rupture. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 31, p. 289-293, 1995.

GETTY, R. Sindesmologia (Artrologia). In: _____. **Anatomia dos animais domésticos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1986.

GYGER, O.; BOTTERON, C.; DOHERR, M.; ZURBRIGGEN, A.; SCHAWALDER, P.; SPRENG, D. Detection and distribution of apoptotic cell death in normal and diseased canine cranial cruciate ligaments. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 2, p.1-7, 2006.

HARASEN, G. Canine cranial cruciate ligament rupture in profile. **Canadian Veterinary Journal**, v. 44, p. 845-846, 2003.

HASSELL, J. R.; KIMURA, J. H.; HASCALL, V. C. Proteoglycan core protein families. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 539-567, 1986.

HAYASHI, K.; FRANK, J. D.; DUBINSKY, C.; HAO, Z.; MARKEL, M. D.; MANLEY, P. A.; MUIR, P. Histologic changes in ruptured canine cranial cruciate ligament. **Veterinary Surgery**, v. 32, n. 3, p. 269-277, 2003.

HAYASHI, K.; MANLEY, P. A.; MUIR, P. Cranial cruciate ligament pathophysiology in dogs with cruciate disease: a review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, p. 385-390, 2004.

HEFFRON, L. E.; CAMPBELL, J. R. Morphology, histology and functional anatomy of the canine cranial cruciate ligament. **Veterinary Record**, v. 102; n. 13; p. 280-283, 1978.

JOHNSON, J. M.; JOHNSON, A. L. Cranial cruciate ligament rupture: pathogenesis, diagnosis, and postoperative rehabilitation. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 23, n. 4, p. 717-733, 1993.

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrossirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Kogan, 2004.

KIM, A. C.; SPECTOR, M. Distribution of chondrocytes containing α -smooth muscle actin in human articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 18, p. 749-755, 2000.

KOBAYASHI, D.; KUROSAKA, M.; YOSHIYA, S.; MIZUNO, K. Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of defects in canine anterior cruciate ligament. **Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy**, v. 5, p. 189-194, 1997.

LORENZ H.; WENZ, W.; IVANCIC, M.; STECK, E.; RICHTER, W. Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. **Arthritis Research Therapy**, v. 7, n. 1, p. 156-165, 2004.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. Biology of Collagen. **Revue Canadienne de Biologie Expérimentale**, v. 41, n. 2, p. 143-156, 1982.

MONTES, G. S. Distribution of oxytalan, elaunin and elastic fibres in tissues. **Journal of the Brazilian Association for Advancement of Science**, v. 44, n. 4, p. 224-233, 1992.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p. 15-27, 1996.

MORAES, S. G.; PINHEIRO, M. C.; TOLEDO, O. M. S.; JOAZEIRO, P. P. Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. **Cell Tissue Research**, v. 315, p. 223-231, 2004.

MURRAY, M. M.; MARTIN, S. D.; MARTIN, T. L.; SPECTOR, M. Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 82, n. 10, p. 1387-1398, 2000.

MURRAY, M. M.; SPECTOR, M. The migration of cells from the ruptured human anterior cruciate ligament into collagen-glycosaminoglycan regeneration templates in vitro. **Biomaterials**, v. 22, p. 2393-2402, 2001.

NEURATH, M. F.; PRINTZ, H.; STOFFT, E. Cellular ultrastructure of the ruptured anterior cruciate ligament. A transmission electron microscopic and immunohistochemical study in 55 cases. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 65, p. 71-76, 1994.

NEWTON, P. O.; WOO, S. L. Y.; KITABAYASHI, L. R.; LYON, R. M.; ANDERSON, D. R.; AKESON, W. H. Ultrastructural changes in knee ligaments following immobilization. **Matrix**, v. 10, p. 314-319, 1990.

ORFORD, C. R.; GARDNER, D. L.; O'CONNOR, P. Ultrastructural changes in dog femoral condylar cartilage following anterior cruciate ligament section. **Journal of Anatomy**, v. 137, n. 4, p. 653-663, 1983.

OTTANI, V.; RASPANTI, M.; RUGGERI, A. Collagen structure and functional implications. **Micron**, v. 32, p. 251-260, 2001.

PANULA, H. E.; HYTTINEN, M. M.; AROKOSKI, J. P. A.; LANGSJO, T. K.; PELTTARI, A.; KIVIRANTA, I.; HELMINEN, H. J. Articular cartilage superficial zone collagen birefringence reduced and cartilage thickness increased before surface fibrillation in experimental osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases** v. 57, p. 237-245, 1998.

PECORA, J. R.; RODRIGUES, C. J.; RODRIGUES, A. J.; SALOMÃO, O. Densidade linear do sistema de fibras elásticas dos ligamentos patelar, cruzado anterior e cruzado posterior. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 55-62, 2001.

PINHEIRO, M. C.; MORAES, S. G.; BATTLEHNER, C. N.; CALDINI, E. G.; TOLEDO, O. M. S.; JOAZEIRO, P. P. Histochemical and ultrastructural study of collagen fibers in mouse pubic symphysis during late pregnancy. **Micron**, v. 35, p. 685-693, 2004.

SAPPINO, A. P.; GABBIANI, G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. **Laboratory Investigation**, v. 63, p. 144-161, 1990.

SARGON, M. F.; DORAL, M. N.; ATAY, O. A. Age-related changes in human PCLs: a light and electron microscopic. **Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy**, v. 12, p. 280-284, 2004.

SCAVELLI, T. D.; SCHRADER, S. C.; MATTHIESEN, D. T.; SKORUP, D. E. Partial rupture of the cranial cruciate ligament of the stifle in dogs: 25 cases (1982-1988). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 7, p. 1135-1138, 1990.

SCHMITT-GRAFF, A.; DESMOULIERE, A.; GABBIANI, G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. **Virchows Archiv**, v. 425, n. 1, p. 3-24, 1994.

STOCKWELL, R. A.; BILLINGHAM, M. E. J.; MUIR, H. Ultrastructural changes in articular cartilage after experimental section of the anterior cruciate ligament of the dog knee. **Journal of Anatomy**, v. 136, n. 2, p. 425-439, 1983.

TATARUNAS, A. C. **Estudo artroscópico das articulações do ombro e joelho no cão**. Tese (Doutorado). 2004. 148 f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

VASSEUR, P. B. Stifle joint. In: _____. **Textbook of small animal surgery**. 2. EUA ed. W. B. Saunders, 1993.

VASSEUR, P. B.; POOL, R. R.; ARNOCZKY, S. P.; LAU, R. E. Correlative biomechanical and histological study of the cranial cruciate ligament in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 9, p. 1842-1854, 1985.

VIANNA, R. S. **Estudo histométrico do ligamento cruzado cranial no cão (*Canis familiaris*)**. Tese (Doutorado) 2000. 89 p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

WHITEHAIR, J. G.; VASSEUR, P. B.; WILLITS, N. H. Epidemiology of cranial cruciate ligament rupture in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 7, p. 1016-1019, 1993.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Ficha de coleta de material

FICHA DE COLETA DE MATERIAL

PRONTUÁRIO:

DATA DA CIRURGIA:

Nome:

Idade:

Raça:

Sexo:

Peso:

HISTÓRICO:

Tempo de evolução (tempo considerado: queixa do proprietário + tempo de espera até a data da coleta/ cirurgia):

Diagnóstico Pré Operatório:

Articulação afetada:

EXAME CLÍNICO

Gaveta

EXAMES COMPLEMENTARES

RX

Outros

CIRURGIA

Procedimento: Artroscopia/Artrotomia

Cirurgião:

Horário de início:

Horário de término:

Comentários:

Diagnóstico pós-operatório:

LÍQUIDO SINOVIAL

Quantidade

Aspecto

Cor

Viscosidade

COLETA DE MATERIAL

Hora:

Número de frascos:

Fixador: paraformol

Identificação do material:

APÊNDICE B- Tabelas

Tabela 10- Valores correspondentes à fração de área ocupada por metaplasia condróide nos fragmentos de LCCr - São Paulo - 2007

CÃO Nº	Fração de área ocupada por metaplasia condróide (%)	Fração de área ocupada por metaplasia condróide (μm^2)
1	0,4	7525,56
2	1,7	19241,50
3	2,8	35575,39
4	4,2	53362,92
5	0,2	2736,57
6	1,5	19384,03
7	0,2	2736,57
8	2,5	33351,93
9	0,34	4326,19
10	0,86	11239,48
11	3,424	39509,21
12	5,285	70694,69
13	0	0
14	4,14	52288,01
15	0	0
16	0,75	9406,95
17	2,44	29646,16
18	3,75	47034,77
19	0,17	1710,35
20	3,41	38197,94
21	0,66	8893,85
22	0,26	3420,71
23	1,88	23076,20
27	0,42	5701,18
29	0	0
30	0	0
31	0,17	2280,47
32	0	0
33	0,36	3364,00
34	0,38	5131,07
35	0	0
36	0	0
38	1,28	17103,55
39	0	0
40	1	13682,84
41	0,83	9692,01
42	0,66	7981,66
43	1,25	16248,38
44	0	0
45	0	0
46	0	0
47	0,33	3420,71
48	0,83	10832,25
49	0,12	855,18
50	1	10262,16
51	0	427,59

Tabela 11- Fração de área ocupada por fibras colágenas nos fragmentos de LCCr-
São Paulo - 2007

CÃO Nº	Fração de área ocupada por colágeno (%)
1	57,75
2	48,71
3	36,97
4	40,60
5	55,60
6	59,76
7	96,00
8	60,91
9	41,16
10	43,61
11	43,82
12	73,53
13	49,75
14	23,16
15	38,53
16	45,32
17	66,81
18	30,23
19	65,21
20	99,14
21	49,68
23	82,31
24	71,30
25	49,30
27	83,47
28	57,48
29	68,24
30	50,38
31	80,61
32	67,59
34	43,83
35	64,01
36	55,69
38	28,78
39	42,04
40	90,56
41	87,00
42	82,44
43	96,30
44	86,24
45	81,46
46	72,27
47	83,93
48	71,19
49	70,07
50	82,89
51	71,15
52	94,57

Tabela 12- Valores correspondentes à densidade linear de fibras do sistema elástico nos fragmentos de LCCr - São Paulo - 2007

CÃO Nº	Densidade linear fibra elástica (μm^2)
1	13797,77
2	5.588
3	2913,50
4	9344,85
5	11.916
6	2909,11
7	3256,47
8	806,36
9	8358,65
10	4303,96
11	28222,5
12	7394,35
13	5080,09
16	22703,60
17	1442,49
18	2046,15
19	940,76
22	1128,91
23	5418,76
25	4346,29
28	2257,81
29	1254,34
32	1763,92
33	4421,56
34	8466,81
36	11966,43
39	3160,94
40	1612,73
41	6886,34
42	4766,50
43	1128,91
44 E	6209,00
44 D	6271,71
45	2383,25
46	4684,97
47	5798,48
48 E	7651,49
48 E	2032,03
49	6604,11
50 E	5926,77
50 D	5136,53
51	6604,11

Tabela 13- Valores correspondentes à fração de área ocupada por proteoglicanas nos fragmentos de LCCr - São Paulo -2007

CÃO N°	Fração de área ocupada por proteoglicanas (%)
1	1,40%
2	8,69%
3	12,75%
4	14,08%
5	2,69%
7	17,66%
8	2,82%
9	7,50%
10	4,03%
11	1,26%
13	5,54%
14	1,05%
15	4,16%
17	10,67%
18	8,82%
19	0,78%
21	15,76%
22	14,09%
23	1,10%
24	2,28%
25	9,01%
27	0,26%
28	0,91%
29	0,39%
30	1,22%
31	0,53%
32	3,38%
33	8,34%
34	5,28%
35	0,72%
38	0,54%
39	6,92%

Tabela 14- Valores correspondentes área necessária para a identificação de uma célula marcada para α -actina de músculo liso nos fragmentos de LCCr - São Paulo - 2007

CÃO Nº	Área necessária para localização de uma célula marcada por α -actina de músculo liso
2	2259,74
3	641,6667
4	1883,75
6	745
8	1244,048
10	1400
11	492,3986
12	1879,167
14	514,5556
17	958,3333
18	308,3717
19	1857,143
20	3047,917
41	1656,111
42	1833,333
49	16000
50	14000
51	6416,667
52	2841,667

Tabela 15- Valores correspondentes à área necessária para a identificação de uma célula marcada para Caspase 3 nos fragmentos de LCCr - São Paulo - 2007

CÃO Nº	Área necessária para localização de uma célula marcada por Caspase 3
2	2700
3	5333,333
4	6500
6	2000
8	1142,857
10	1600
11	1800
12	4222,222
14	1029,178
17	1722,488
18	2019,841
19	4000
20	1313,016
41	7833,333
42	2250
48	6476,19
49	24000
50	24000
51	3428,571
52	3000