

Células-tronco mesenquimais para tratamento de displasia coxofemoral em cão

Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Coxofemoral Dysplasia in a Dog

Matheus Cândido Feitosa¹, Mariane Ubrik Guerrera², Jackson de Oliveira Siqueira²,
Roseane Oliveira Feitosa², Anísio Francisco Soares² & Marcelo Weinstein Teixeira²

ABSTRACT

Background: Coxofemoral dysplasia (CFD) is the abnormal development of the hip joint, mostly affecting large breeds, and is characterized by subluxation or complete luxation of the femoral head. Among the conservative therapeutic options, cell therapies with stem cells for CFD provides potential by the countless possibilities of therapeutic application, especially those related to the chronic and/or degenerative diseases treatment, which could be a key point for the bone and joint repair. The objective was to report a bilateral CFD case in a dog, treated with intra-articular application of mesenchymal stem cells (MSC), with 0, 30, 60 and 90 days, and further evaluations.

Case: A 2-year-old male Akita dog was referred to the Veterinary Hospital Harmonia (HVH) located in the city of Recife, Pernambuco, presenting clinical signs of hip pain, lameness and pelvic limbs hopping. By orthopedic examination, pain was observed at the cranial and caudal extension of the pelvic limb, and at flexion, abduction and adduction of the limb, as well as moderate muscle atrophy and presence of joint crackling. By coxofemoral radiography performed in ventrodorsal projection, it were detected bilateral femoral head subluxation, thickening of the femoral neck and the presence of intra-articular osteophytes. These findings are compatible with the degeneration caused by the presence of CFD. Laboratory tests performed such as hemogram and biochemical had no changes. Thus, the patient had intra-articular application of allogeneic MSC, derived from adipose tissue, obtained by private company. For stem cell applications, arthrocentesis of the hip joints was performed one at a time, using a 5 mL syringe and 16G needle for aspiration of 2 mL synovial fluid, for discard and application of stem cells. After aspiration, the syringe containing the MSC were fitted to the 16G needle for the implant. After the final procedure, the patient was moved to the internment division for anesthetic recovery. The animal was clinically assessed on days 0, 30, 60 and 90 following the criteria of locomotion and physical-orthopedic examination, in which the results were interpreted by a numerical scale.

Discussion: For locomotion, there were differences for the pattern observed on days 0, 30, 60 and 90, with reduced claudication until walking without changes. There was also a decrease in the range of motion until limitations absent. For the parameters such as functional capacity and claudication at trot, there were reductions from the 30th day, promoting a slightly rigid gait, being noticeable when running. For the clinical parameters used in the physical-orthopedic evaluation, regarding the parameters analysis such as pain, caudal extension, cranial extension, internal rotation, abduction, and adduction, there were differences from the 30th day through pain reduction, remaining on the 60th and 90th days. Regarding the muscle atrophy, a difference was observed in the right pelvic limb on the 60th day, with moderate recovery. In addition, for the station tests and presence of joint crackling in the pelvic joint, there were no differences for the pattern during data collection regarding all evaluations. Those results allow inferring that MSC contributed to the CFD treatment, promoting the reduction of clinical signs and, consequently, providing a better life quality of the patient, which positively characterize it as a modality of treatment.

Keywords: veterinary orthopedic, lameness, joint, genetic disease, degenerative disease.

Descritores: ortopedia veterinária, claudicação, articulação, doença genética, doença degenerativa.

DOI: 10.22456/1679-9216.119574

Received: 14 November 2021

Accepted: 2 March 2022

Published: 26 March 2022

¹Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE, Brazil. ²Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE. CORRESPONDENCE: M.C. Feitosa [matheus--candido@hotmail.com]. Rua Dom Manuel Medeiros s/n. CEP 52171-900 Recife, PE, Brazil.

INTRODUÇÃO

A displasia coxofemoral (DCF) é descrita como uma doença de caráter genético, de natureza poligênica e multifatorial [12]. Há acentuada disparidade no desenvolvimento de tecidos moles e ósseos resultando em instabilidade articular e incongruência da articulação coxofemoral (ACF). O processo inflamatório contínuo local e o desgaste provocam perda da conformação normal articular, isso altera a biomecânica da articulação devido a irregularidades na superfície articular, além de haver relaxamento dos ligamentos resultando em alterações degenerativas como: formação de osteófitos, espessamento do colo femoral, fibrose da cápsula articular e subluxação da cabeça femoral [9].

Observando a evolução da doença e a busca por tratamentos, novos métodos têm sido estudados no intuito de minimizar a sintomatologia clínica, além de promover melhoria na qualidade de vida dos pacientes [7], e a partir disso, surge como uma nova alternativa, a utilização da terapia celular no manejo de pacientes acometidos pela DCF [1,10]. O tipo celular específico utilizado nesse estudo são as células-tronco mesenquimais (CTM), as moléculas bioativas secretadas por esse tipo celular, exercem efeitos tróficos a nível local nos tecidos, atuando na produção de proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento, permitindo interação celular e quimiotaxia para outras células jovens para o processo de reparação tecidual [2]. Estudos mostram a capacidade das células-tronco (CT) no tratamento de doenças degenerativas e suas possibilidades terapêuticas, trazendo as CTM e sua capacidade de diferenciar-se em variados tecidos, além de efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores e imunossupressores [6]. Sendo assim, o objetivo do estudo é relatar o tratamento de displasia coxofemoral em um cão utilizando CTM.

CASO

Um cão macho, da raça Akita com 2 anos de idade, foi atendido no Hospital Veterinário Harmonia (HVH) em Recife-PE, apresentando sinais de dor no quadril, claudicação e saltitar, principalmente durante a realização de movimentos diários. Ao exame ortopédico da articulação coxofemoral, observou-se presença de dor na extensão cranial e caudal do membro pélvico (MP), dor a flexão, dor a abdução e adução, além de leve atrofia muscular e presença de crepitação

articular. Foram realizados exames hematológicos como: hemograma, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, ureia e creatinina, os quais não apresentaram alterações.

Na radiografia da região coxofemoral, em projeção ventrodorsal, observou-se raseamento acetabular, subluxação das cabeças femorais, espessamento do colo femoral e presença de osteófitos, achados compatíveis com DCF. O animal foi encaminhado para o bloco cirúrgico e submetido à aplicação de CTM no dia zero, e avaliações clínicas nos dias 0, 30, 60 e 90 posteriores ao procedimento.

Para a aplicação de CTM o animal foi submetido a indução anestésica e realizado antissepsia tópica com uso de álcool 70%¹, seguido de clorexidina 2%², iodopovidona 1%² e por último álcool 70%¹, seguida de fixação de panos cirúrgicos. As CTM utilizadas nesse estudo foram derivadas de tecido adiposo, permitindo maior facilidade em relação ao manejo e atuação local, além de eficiente quimiotaxia junto ao processo de reparação tecidual. Tais células foram obtidas junto a uma empresa particular⁴.

Os criotubos contendo 2×10^6 de células foram mantidos em nitrogênio líquido até o descongelamento (Figura 1), colocados em banho-maria por 2 min a 37°C, e transferido para a solução de descongelamento, onde foi centrifugado para em seguida ser adicionada a solução de lavagem 1. Após o descarte do sobrenadante foi adicionado à solução de lavagem 2 e centrifugado mais 5 min, e então adicionado 1 mL de solução fisiológica 0,9% e encaminhado para implante nas ACF. Para

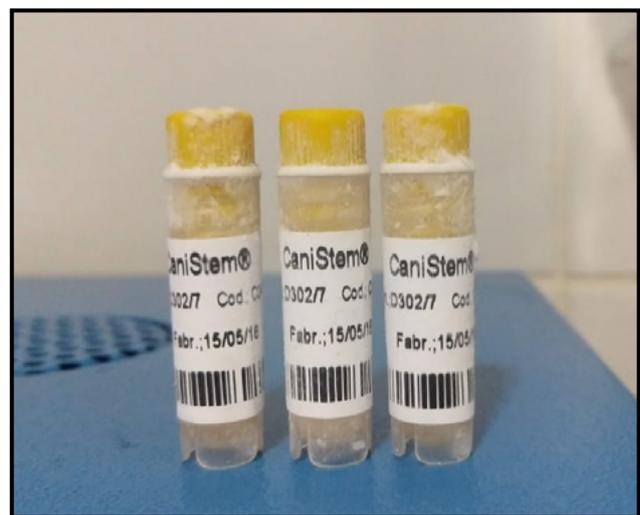


Figura 1. Criotubos contendo células-tronco mesenquimais, recém-saídos do nitrogênio líquido, no início de processo de descongelamento para aplicação em articulação coxofemoral de um cão da raça Akita.



Figura 2. Células-tronco mesenquimais sendo aplicadas diretamente em articulação coxofemoral esquerda de um cão da raça Akita acometido por displasia coxofemoral.

a aplicação das CT, foram realizadas artrocenteses da ACF, uma por vez, e acoplada uma seringa de 5 mL a um cateter 16G⁵ para aspirar 2 mL de líquido sinovial e implantar o mesmo volume de CT nas ACFs (Figura 2). Após encerramento do procedimento, o paciente foi encaminhado ao setor de internamento para recuperação anestésica.

Não foi realizada prescrição de fármacos para não haver interferências nos resultados do estudo, assim como não foi associado o tratamento com fisioterapia. Para averiguar o efeito das CTM os parâmetros clínicos estabelecidos foram baseados nos resultados obtidos por Black *et al.* [1]. Uma pontuação de escalas numéricas foi atribuída para avaliação de cada membro levando em consideração a locomoção e avaliação físico-ortopédica, sendo todas as avaliações feitas pelo mesmo profissional.

Definiu-se como avaliação durante a locomoção, a análise dinâmica observando claudicação ao caminhar e ao trote, amplitude de movimento e capacidade funcional. Como avaliação ortopédica, foi observada presença de dor durante extensão cranial, extensão caudal, flexão, rotação externa e abdução, bem como grau de atrofia muscular, crepitação articular e o teste de estação bípede.

DISCUSSÃO

Estudos anteriores realizados [1] a partir de um ensaio clínico randomizado, baseando-se na avaliação dos parâmetros tanto em locomoção como físico-ortopédica, pós-aplicação intra-articular de CTM

derivadas de tecido adiposo para tratamento de cães com osteoartrite na ACF, observou que os animais do estudo obtiveram melhoras significativamente positivas em relação à claudicação, amplitude de movimento e dor a manipulação ao longo do tempo do estudo após 30, 60 e 90 dias de aplicação.

Os parâmetros clínicos utilizados na avaliação dos MP's durante a locomoção nos dias 0, 30, 60 e 90 para os parâmetros claudicação ao caminhar e amplitude de movimento, houveram redução do padrão notado no dia 0. No dia 30, foi notada evolução de claudicação ao caminhar de forma discreta e contínua até ausência de claudicação, além de ir de diminuição discreta na amplitude de movimento até não haver mais limitações da amplitude, tanto no dia 30, como os dias 60 e 90.

Para os parâmetros capacidade funcional e claudicação ao trote, o paciente obteve leve redução do padrão durante a avaliação a partir do dia 30, passando a andar ligeiramente rígido, sendo perceptível na amplitude dos movimentos, além de claudicação discreta e contínua. Para os parâmetros clínicos utilizados na avaliação físico-ortopédica nos dias 0, 30, 60 e 90, durante a análise de dor a extensão caudal, dor a rotação interna, dor a abdução e adução, houve diferença quanto ao padrão encontrado no dia 0 e no dia 30, passando de dor severa a apresentação moderada, com melhora nos dias 60 e 90.

Para dor a extensão cranial e dor a flexão dos membros pélvicos, o paciente obteve redução do padrão apresentado no dia 0, notado a partir da avaliação do dia 30, com melhora nos dias 60 e 90. O paciente passou de dor na extensão cranial discreta e moderada, a ausência dos sinais de dor no dia 90. O parâmetro dor a extensão cranial em MPE obteve discreta melhora na análise a partir do dia 30, se mantendo no dia 60 e reduzindo no dia 90, e quanto a atrofia muscular existente em MP, foi notada diferença apenas em MPD durante análise no dia 60, onde o paciente passou a apresentar melhora moderada. Já para os testes em estação bípede e presença de crepitação articular na ACF, não se obteve diferença durante a coleta dos dados nos dias 30, 60 e 90 de avaliação.

Os dados apresentados em estudos anteriores [1,13] demonstraram redução da claudicação, melhora discreta na capacidade funcional dos membros pélvicos e demonstração da dor do paciente deste estudo, possivelmente explicados devido ao melhor preenchimento da lesão condral e melhora da cicatrização articular

local, associados ao processo de inflamação e reparo tecidual da ACF com a terapia celular, causando redução da dor a locomoção e manuseio da articulação, com evidências da presença de ilhotas de tecido ósseo circundado por membrana conjuntiva ossificante, como osteoblastos. As moléculas bioativas das CTM exercem efeitos tróficos nos tecidos, atuando na produção de moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com as demais células e quimiotaxia para outras células jovens comprometidas com o processo de reparação tecidual [2].

Em trabalho comparando a regeneração cartilaginosa da ACF de coelhos, com e sem injeção de CTM autólogas após indução de osteoartrite, por meio de exame histopatológico, realizando avaliações aos 30, 60 e 90 dias após aplicação, obteve em seus resultados histológicos melhora discreta na qualidade do tecido de reparo da cartilagem [3]. Com relação à atrofia muscular presente no paciente do relato de caso, não houve melhora na graduação no padrão de notas nos dias de avaliação, o que pode estar relacionado com a presença das lesões musculares em vista do tempo de não uso da musculatura local devido a DCF, a presença de dor e o grau de atrofia presente [8]. Da mesma forma, não foram observadas diferenças nos dias de avaliação no que se refere à crepitação articular

do paciente, confirmando que as CTM não possuem melhora significativa relacionada à crepitação [11].

As observações obtidas neste estudo referentes à melhora na sintomatologia do paciente podem se relacionar aos efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores, imunossuppressores, angiogênicos, quimiotáxicos e antiapoptóticos das CTM [4,5,11]. Neste estudo a escolha pela utilização das CTM alógenas obtidas por meio de uma empresa comercial baseou-se na facilidade de obtenção e manejo, além da possibilidade de conservação, permitindo disponibilidade imediata por já haver previamente um banco celular. Os resultados obtidos permitem inferir que as CTM alógenas contribuíram no tratamento da DCF, permitindo redução dos sinais clínicos e conseqüentemente propiciando uma melhor qualidade de vida ao paciente do estudo, caracterizando-a positivamente como modalidade de tratamento.

MANUFACTURERS

¹Jalles Machado S.A. Goianésia, GO, Brazil.

²Riohex e Riodefne, Rioquímica S.A. São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁴Regenera Medicina Veterinária Avançada S.A. Campinas, SP, Brazil.

⁵Descarpack Descartáveis do Brasil. São Paulo, SP, Brazil.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

- 1 Black L. L., Gaynor J., Gahring D., Adams C., Aron D., Harman S. & Harman R. 2007. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter controlled trial. *Veterinary Therapeutics*. (8) 4: 272-284.
- 2 Bobis S., Jarocho D. & Majka M. 2006. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 44(4): 215-230.
- 3 Coelho L. P. 2017. Células-tronco mesenquimais autólogas na articulação coxofemoral em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). 91f. São Paulo, SP. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual Paulista.
- 4 Desando G., Grigolo B., Florentino Á.D.P., Teixeira M.W., Barbagallo F., Naro F., Silva Jr. V.A. & Soares A.F. 2021. Preclinical Evidence of Intra-Articular Autologous Cartilage Micrograft for Osteochondral Repair: Evaluation in a Rat Model. *Cartilage*. 73(1): 132-140. DOI: 10.1177/19476035211042408
- 5 Markoski M.M. 2016. Advances in the Use of Stem Cells in Veterinary Medicine: From Basic Research to Clinical Practice. *Scientifica*. 1: 12-13. DOI: 10.1155/2016/4516920.
- 6 Salgado A.J.B.O.G., Reis R.L.G., Sousa N.J.C. & Gimble J.M. 2010. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 5(2): 103-110. DOI: 10.2174/157488810791268564.
- 7 Schiller T.D. 2017. Biomedtrix Total Hip Replacement Systems: An Overview. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 47(4): 899-916. DOI: 10.1016/j.cvsm.2017.03.005.

- 8 **Silva Meirelles L., Fontes A.M., Covas D.T. & Caplan A.I. 2009.** Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 20(5): 419-427. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.
- 9 **Siqueira J.O. 2018.** Uso de células-tronco mesenquimais halógenas derivadas de tecido adiposo (AD-CTM) no tratamento de displasia coxofemoral em cães (*Canis lupus familiaris*). 65f. Recife, PE. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- 10 **Tôrres R.C.S., Araújo R.B. & Rezende C.M.F. 2005.** Distrator articular no diagnóstico radiográfico precoce da displasia coxofemoral em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 57: 27-34. DOI: 10.1590/S0102-09352005000100004
- 11 **Vilar J.M., Batista M., Morales M., Santana A., Cuervo B., Rubio M. & Carrillo J.M. 2014.** Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Veterinary Research*. 10(1): 143. DOI: 10.1186/1746-6148-10-143.
- 12 **Whitworth D.J. & Banks T.A. 2014.** Stem cell therapies for treating osteoarthritis: Prescient or premature. *The Veterinary Journal*. 202(3): 416-424. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.09.024.
- 13 **Zhang Z., Zhu L., Sandler J., Friedenber S.S., Egelhoff J., Williams A.J. & Todhunter R.J. 2009.** Estimation of heritabilities, genetic correlations, and breeding values of four traits that collectively define hip dysplasia in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 70(4): 483-492. DOI: 10.2460/ajvr.70.4.483.