

## SCAFFOLD DE COLÁGENO LIOFILIZADO E HIDROLIZADO EMBEBIDO COM A FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓGENAS DA MEDULA ÓSSEA NA REPARAÇÃO AGUDA PRIMÁRIA DE TENDÃO CALCÂNEO DE CÃES

OLSSON, D.C.<sup>1</sup>, TREICHEL, T.L.E.<sup>1\*</sup>, PIPPI, N.L.<sup>2</sup>, SAUSEN, L.<sup>3</sup>,  
CUNHA, J.P.M.C.M.<sup>3</sup>, SPRADA, A.G.<sup>3</sup>, ROSA, M.B.<sup>3</sup>

Para o experimento foram utilizados 36 cães hípidos, de ambos os sexos, sem raça definida (s.r.d.), com idades estimadas entre um e dois anos, pesando ao redor de 10 kg, provenientes do Biotério Central da UFSM. Previamente ao experimento os animais foram medicados contra endoparasitas e ectoparasitas e, submetidos aos exames físicos, clínicos, hematológicos para a certificação da obtenção de animais hípidos. Os cães passaram por um período de adaptação humana, ambiental e alimentar de 30 dias. Foram utilizados para o experimento os animais que se encontraram em estado de normalidade em todos os parâmetros que foram avaliados. Os animais considerados aptos foram separados em quatro grupos experimentais com nove cães cada e mantidos em canis climatizados apropriados, com cuidados individuais, recebendo água e ração comercial *ad libitum* até o final do experimento.

Os 36 cães foram distribuídos de forma randomizada em quatro grupos experimentais com nove cães, correspondendo a um tratamento de acordo com o modo de aplicação de *scaffold* e terapia celular. Cada grupo de nove animais foi subdividido em três grupos: a, b, c de acordo com o tempo de avaliação citológica e biópsia histológica. Os grupos foram denominados conforme o seguinte delineamento:

Grupo I (GI) - nove animais sofreram tenectomia do tendão calcâneo comum no membro pélvico direito (MPD), mantendo-se 1 cm do mesmo nas junções teno-óssea e teno-muscular. No defeito cirúrgico os animais foram tratados com a Fração Total de Células Mononucleares (FTCM) autógenas colhidas da Medula Óssea (MO), marcadas com nanocristal *quantum dot* (Qtraker 655®) e injetadas no *scaffold* de esponja de colágeno hidrolizada e liofilizadas (Hemospon®), envolvidas pelo paratendão do próprio membro. Grupos de três animais foram avaliados por *imprint* citológico, *imprint* fluorescente e biópsia histológica aos sete (GIa), quatorze (GIb) e trinta dias (GIc).

Grupo II (GII) - nove animais sofreram tenectomia do tendão calcâneo comum do MPD, mantendo-se 1 cm do mesmo nas junções teno-óssea e teno-muscular. No defeito cirúrgico os animais foram tratados com a FTCM autógenas colhidas da MO, marcadas com nanocristal *quantum dot* (Qtraker 655®) e injetadas diretamente dentro do paratendão do membro, envolvendo a lesão cirúrgica. Grupos de três animais foram avaliados por *imprint* citológico, *imprint* fluorescente e biópsia histológica aos sete (GIIa), quatorze (GIIb) e trinta dias (GIIc).

Grupo III (GIII) – nove animais sofreram tenectomia do tendão calcâneo comum no MPD, mantendo-se 1 cm do mesmo nas junções teno-óssea e teno-muscular. No defeito cirúrgico os animais foram tratados somente com *scaffold* de esponja de colágeno hidrolizada e liofilizada (Hemospon®), marcada com nanocristal *quantum dot* (Qtraker 655®) e envolvidos pelo paratendão do próprio membro. Grupos de três animais foram avaliados por *imprint* citológico, *imprint* fluorescente e biópsia histológica aos sete (GIIIa), quatorze (GIIIb) e trinta dias (GIIIc).

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

\*Apresentador: tiagoufsm@yahoo.com.br.

<sup>2</sup> Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Grupo IV (GIV) – nove animais sofreram tenectomia do tendão calcâneo comum no MPD, mantendo-se 1 cm do mesmo nas junções teno-óssea e teno-muscular. No defeito cirúrgico os animais foram tratados somente com solução salina 0,9% marcadas com nanocrystal *quantum dot* (Qtraker 655®). Grupos de três animais foram avaliados por *imprint* citológico, *imprint* fluorescente e biópsia histológica aos sete (GIVa), quatorze (GIVb) e trinta dias (GIVc).

#### **Colheita da FTCM da MO**

Após todos os procedimentos de tricotomia da área lombar da crista ilíaca até os coxins plantares do MPD os animais foram anestesiados. O pré-operatório constou de jejum alimentar de 12 horas e hídrico de seis horas. A medicação pré-anestésica foi consistida de acepromazina ( $0,05\text{mg.Kg}^{-1}$ ) e fentanil ( $0,002\text{mg.Kg}^{-1}$ ) aplicadas por via intra-muscular (IM). A anestesia epidural foi realizada com morfina ( $0,1\text{mg.Kg}^{-1}$ ), lidocaína 2% ( $0,25\text{mg.Kg}^{-1}$ ) e bupivacaína 0,25% ( $0,25\text{ mg.Kg}^{-1}$ ). Realizou-se a indução anestésica com propofol ( $4\text{mg.Kg}^{-1}$ ) pela via endoflébica e, como manutenção anestésica utilizou-se anestesia geral inalatória com halotano vaporizado em oxigênio a 100%, administrado em circuito semi-fechado. Para a profilaxia antimicrobiana trans-operatória foi utilizado cefalotina ( $30\text{mg. Kg}^{-1}$ ) por via intravenosa (IV) e, para analgesia foi administrado parecoxib sódico ( $2\text{ mg.kg}^{-1}$ ) (IV).

Durante a intervenção cirúrgica, foi administrada solução salina 0,9% em gotejamento venoso de 10 a 15 ml.  $\text{Kg}^{-1}.\text{h}$  e, com auxílio de um oxímetro de pulso foi monitorada a perfusão capilar e pressão arterial por meio de um sensor conectado à língua do paciente, enquanto um aparelho de eletrocardiograma monitorou o ritmo cardíaco e grau de oxigenação tecidual.

Os animais foram colocados em decúbito lateral direito e submetidos à colheita de sangue da MO. As amostras foram obtidas por punção rotacional e aspiração com o auxílio de agulha do tipo Steis (15 G X 3"). Os locais de punção foram na fossa trocantérica femoral do MPD. A colheita foi realizada com seringas de 20ml previamente heparinizadas com liquemine (10.000UI). Para penetrar no espaço medular dos ossos foi aplicada uma pressão manual, moderada à agulha, girado-a e alternando os movimentos para direita e esquerda. Através de uma pressão negativa na seringa, foi colhida a MO dos ossos na quantidade total necessária de  $10\text{ml. kg}^{-1}$ . À medula foi colhida e transferida para a bolsa de colheita de MO, Kit Collection Bone Marrow®, contendo 0,1ml de liquemine e 10ml de solução salina 0,9% para cada 100ml de MO. O total de sangue intramedular colhido passou pelo pré-filtro de 500 microns e pelo filtro de 200 micras acoplados em linha, no kit collection, para filtragem das espículas ósseas e acondicionada em bolsa de transporte estéril. No momento da colheita, uma alíquota de 1ml de MO foi divididas em duas frações de 0,5 ml e encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias para contagem manual da porcentagem de células nucleadas totais e teste de viabilidade celular com o corante vital azul de Trypan em lâmina de microscopia, sendo considerada aceitável uma viabilidade acima de 90%. A outra fração de 0,5 ml foi usada para confecção de esfregaços em lâminas microscópicas para exame de mielograma (osteomiograma) e análise morfológica das células da MO. Foram confeccionadas 10 lâminas por amostra e coradas com kit panótico rápido (álcool fixador - corante eosinofílico – corante basofílico).

#### **Isolamento da FTCM da MO**

A MO colhida ( $10\text{ml.kg}^{-1}$ ) foi centrifugada a 1600 rotações por minuto (RPM) (440 X G) em tubos Falcon de 50ml e isolada em gradiente de densidade Histopaque® 1.077, de acordo com a técnica de Boyum modificada. O halo contendo a FTCM foi colhido com pipeta automática, lavada em solução salina 0,9% e DMEM com glicose a 2% estéril, para novamente serem centrifugadas por cinco minutos com intuito de remover os agregados celulares e novamente lavadas em solução salina 0,9% e DMEM com glicose a 2% estéril,

obtendo o produto final o botão celular padronizado em 500µl. Uma pequena fração (70µl) de FTCM suspensas foi colhida com pipeta automática para quantificação manual da porcentagem de células mononucleares, e teste de viabilidade celular com azul de Trypan 1% em lâmina de Neubauer, sendo considerada aceitável uma viabilidade acima de 90%. O restante do botão (430µL) contendo a FTCM foi marcado com nanocristal *quantum dot* (Qtraker 655®) e incubado para posterior aplicação terapêutica.

### **Intervenção cirúrgica**

Os animais já estavam acordados do primeiro procedimento para colheita de medula óssea ocorrido há uma hora e meia atrás e foram novamente anestesiados conforme protocolo descrito anteriormente.

Após todos os procedimentos para cirurgia asséptica, os animais dos grupos GI, GII, GIII e GIV sofreram tenectomia parcial do tendão calcâneo comum direito. Para acesso ao tendão foi realizada uma abordagem pela face medial por incisão de pele e tecido subcutâneo, até a exposição do tendão. O tendão calcâneo exposto foi seccionado proximal e distalmente, em uma área medial à exposição e, o segmento retirado foi de 1 cm de comprimento, sendo que esse foi medido com régua calibrada estéril anteriormente a incisão. Realizada a tenectomia, os cotos remanescentes foram alinhados para tenorrafia primária. As anastomoses foram feitas com fio de mononáilon 3-0, pela técnica de Kessler modificada. Suas extremidades não foram aproximadas, ficando um espaço entre elas de 1 cm preenchida pelo fio mononáilon 3-0 e por um fragmento de esponja hemostática de colágeno hidrolisado liofilizada (Hemospon®), medindo 1x1x1 cm, nos grupos GI e GIII, fazendo a ponte de união entre os cotos das extremidades. Nos grupos GII e GIV, após a tenectomia, os cotos remanescentes foram alinhados para tenorrafia primária somente pelo fio mononáilon 3-0. A síntese do paratendão em todos os grupos foi realizada com pontos simples contínuos e fio absorvível sintético poliglactina 4-0.

Após o procedimento de tenectomia do tendão calcâneo direito, os animais dos grupos GI receberam *scaffold* de colágeno hidrolizado e liofilizado (Hemospon®) embebidos na FTCM autógenas, marcadas com nanocristal, introduzido no interior do paratendão suturado por um acesso ainda aberto, que envolveu os cotos do tendão e posteriormente suturado. Em seguida os planos abordados foram reconstituídos com pontos simples isolados com fio mononáilon 4-0.

Os animais do grupo GII receberam a injeção contendo 1,5 ml da FTCM com soro autólogo, marcadas com nanocristal que foi injetada no interior do paratendão já suturado. Em seguida os planos abordados foram reconstituídos com pontos simples isolados com fio mononáilon 4-0.

Os animais do grupo GIII receberam *scaffold* de colágeno hidrolizado e liofilizado embebidos com 1,5 ml de soro autólogo marcado com nanocristal, introduzidos dentro do paratendão e posteriormente suturado. Em seguida os planos abordados foram reconstituídos com pontos simples isolados com fio mononáilon 4-0.

Nos animais GIV foi injetada 1,5 ml de solução salina 0,9% marcadas com nanocristal dentro do paratendão suturado. Em seguida os planos abordados foram reconstituídos com pontos simples isolados com fio mononáilon 4-0.

A articulação tibio-tarsiana do MPD de cada animal (GI, GII, GIII, GIV) foi imobilizada com um pino de Steinmann número 2 (SCHMITT et al., 1993). Este pino foi introduzido de forma normógrada fechada através do calcâneo e alojado no canal medular da tíbia. Ao final da introdução (dois terços do canal medular da tíbia), o pino foi dobrado e cortado. Esta dobra foi acomodada no tecido subcutâneo para minimizar a contaminação e a articulação permaneceu imobilizada pelo período de 30 dias e foram submetidos à caminhadas com guia três vezes ao dia em terreno plano.

No pós-operatório imediato foi administrada morfina  $0,1\text{mg.kg}^{-1}$  por via epidural entre L7 e S1 para potencializar a analgesia. Após a intervenção todos os animais receberam analgesia com parecoxib sódico ( $2\text{ mg.kg}^{-1}$ ) SID, durante três dias consecutivos.

### **Estudo clínico**

A avaliação clínica iniciou no pós-operatório imediato e continuou diariamente até o final do experimento e, semanalmente receberam notas de acordo com o grau de deambulação. Foi estimada a recuperação do uso funcional do membro pélvico direito, mediante cinco graus, de acordo com as características de deambulação, em graus correspondentes pela tabela modificada de TUDURY & RAISER (1985).

Características da deambulação, em graus correspondentes, para avaliação clínica pós-operatória de cães submetidos à terapia da tenectomia aguda com *scaffold* de colágeno liofilizada e hidrolizada e transplante de células mononucleares da medula óssea.

### **Estudo histológico e citológico**

Para a obtenção das amostras para *imprints* e biópsia tecidual, os animais foram anestesiados conforme o protocolo descrito inicialmente e submetidos à cirurgia asséptica.

No momento da exposição do tendão, foi retirado um fragmento de aproximadamente 4 cm que acolhesse ambos os cotos tenectomizados de cada animal. O fragmento colhido foi colocado em placa de Petri e com uma lâmina de bisturi número 10 o fragmento foi seccionado em quatro outros fragmentos. Com uma pinça anatômica, estes fragmentos foram pressionados contra as lâminas, perfazendo um total de 10 lâminas por amostra e encaminhados para coloração com kit panótico rápido e submetidos à leitura em microscopia óptica. Em seguida, foram colocados 5 ml de solução salina 0,9% na placa de Petri onde os fragmentos ficaram hidratando por 20 minutos. Após, todos os fragmentos foram novamente seccionados em duas extremidades e foram pressionados manualmente em novas lâminas de vidro estéreis. De todas as amostras colhidas foram confeccionadas 5 lâminas e foram observadas em microscopia de luz fluorescente de iluminação contínua para visibilizar a presença de células mononucleares refletidas. As células que emitiram luz fluorescente foram avaliadas por estudos qualitativos. As amostras fragmentadas foram identificadas e fixadas em formol neutro, processada e corada pelo método Hematoxilina e Eosina, para observar a evolução do processo cicatricial e presença de inflamação.

### **Avaliação clínica**

Todos os animais apresentaram evolução clínica satisfatória durante todo o período de observação para cada grupo. Achados clínicos como discreto aumento de volume local foi observado em todos os animais, principalmente nos grupos G I e GII. Este aumento de volume iniciou-se 24 horas após o implante, permanecendo em média até o sétimo dia do experimento, porém, não foi observado dor à palpação local.

Achados como claudicação esteve presente no pós-operatório, variando em intensidade (leve a moderado) com diferença significativa na comparação entre os contrastes do grupo controle com os demais grupos nos quatorze e trinta dias de avaliação. Quando comparadas as médias do grupo GI em relação ao GII e GIII, a diferença significativa também permanece aos quatorze e trinta dias de avaliação clínica. No entanto, aos sete dias de observação, em todos os grupos, não foi verificada diferença clínica de deambulação evolutiva.

Ao exame radiográfico, não foi observada nenhuma alteração significativa que pudesse comprometer a articulação tíbio-társica. A administração de Parecoxib® surtiu ação antiinflamatória efetiva, já que ao término da terapia, ao primeiro dia do experimento, não foi observada sensibilidade dolorosa à palpação local por quatro dias.

## Discussão

Clinicamente de acordo com a tabela TUDURY & RAISER (1985) não foram observados manifestação de dor e apresentaram rapidamente o grau V de recuperação deambular, 24 horas após o procedimento. A viabilidade da realização desta técnica deve ser ressaltada neste estudo, uma vez que os demais artigos publicados sobre a punção de medula óssea em crista ilíaca de cães relatam a grande dificuldade de introdução de outros tipos de agulhas e também a dificuldade de se conseguir um volume adequado (FERNANDEZ & GRINDEM, 2000). A prática de colheita de medula óssea na crista ilíaca de cães é de difícil manejo devido o formato anatômico do osso e dificuldade de introdução da agulha, aumentando o tempo da permanência do animal anestesiado e tempo de colheita do sangue (CAR & BLUE, 1999). Na técnica que foi utilizada neste trabalho, o tempo total de colheita de medula óssea em todos os cães levou um tempo mínimo de 20 minutos e máximo de 30 minutos. De acordo com a técnica de punção de medula óssea para colheita de células mononucleares realizada por SAMOTO (2006), VAZ (2006) e BARROS et al. (2001), a quantidade de sangue obtida por esta via foi inferior a 50ml e a quantidade de células mononucleares foi inferior a  $2 \times 10^5$ , no entanto, a viabilidade celular foi superior a 90%.

As médias dos contrastes entre grupos referentes ao sétimo, quatorze e trinta dias de avaliação cicatricial foram significativas em todos os animais que receberam células e/ou scaffold (GI, GII e GIII) quando comparados ao grupo controle. Estes animais apresentaram maior proliferação fibroblástica, porém de forma rudimentar, desde a primeira colheita e evidente já no sétimo dia, juntamente com a neovascularização que caracterizaram a formação de tecido de granulação típico do processo de reparação tecidual que foi menos evidente no grupo controle. NIRMALANANDHAN et al. (2006) e AWAD et al. (2000) verificaram que a utilização de scaffolds e células mesenquimais auxiliam principalmente na resistência do tendão durante a primeira fase de regeneração tecidual. Reforçando a teoria, PACINI et al (2007) relatam que na avaliação da tensão mecânica da fibra tendínea, esta pode aumentar em até 30% após regeneração cirúrgica com apenas uma aplicação de no mínimo  $5 \times 10^3$  células mesenquimais /cm<sup>2</sup>.

Em todos os contrastes comparativos entre os grupos (GI, GII e GIII) que receberam células mononucleares e/ou scaffold, nos tempos de sete, quatorze e trinta dias não foram evidenciados histologicamente variação na regeneração, apesar de apresentarem fibras mais alinhadas, neoformação vascular, e diminuição dos infiltrados celulares o processo de evolução mais acentuada foi maior nos primeiros sete dias e após, essa evolução foi mais lenta.

No entanto, quando comparadas as médias da cicatrização entre dias, por grupo, observamos que os animais que receberam scaffold embebidos em células e os que receberam somente scaffold, a qualidade da regeneração com maior organização de fibroblastos foi intensa e mais significativa até o 14<sup>o</sup> dia. Uma preocupação pertinente sobre o uso terapêutico de células-tronco é a possibilidade de que a injeção local das células podem se diferenciar para uma linha inesperada de tenócitos e ocorrer evolução celular inespecífica, causando o aparecimento assim de tecidos ectópicos. Na realidade, scaffolds podem induzir uma reatividade celular no receptor e interferir tanto na regeneração quanto na elasticidade, assim como, produzir reações indesejadas (HARRIS et al., 2004). Esta possibilidade foi provada quando células suspensas em scaffolds apropriados à base de colágeno como adjuvantes da regeneração foram utilizadas em reparos de tendão em coelhos (AWAD et al, 2000), dessa forma, a evolução da regeneração do tendão pode constituir um problema principal, por causa de resistência reduzida e possível reatividade de tecido conseqüente (HARRIS et al., 2004). No entanto, neste estudo, apesar das avaliações

terem sido realizadas somente por trinta dias, nas leituras histológicas não foi observado alteração de linhagem celular e a utilização de esponja de colágeno proporcionou incremento de fibroblastos alinhados, indicando fase ativa de colágeno nos dois grupos que os receberam como adjuvantes.

Esses dados corroboram com os encontrados por JUNCOSA-MELVIN et al. (2006) que transplantaram esponja de colágeno com células-tronco autógenas para recuperação tendínea e ocorreram manifestações de melhora mecânica e histopatológica dos tendões até doze dias após cirurgia.

### **Referências**

- AWAD H. A. et al. *In vitro* characterization of mesenchymal stem cells seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, p. 229-233, 2000.
- BARROS, S.V.S.G. et al. Autoenxerto percutâneo de medula óssea em coelhos. I coleta, reparo e aplicação. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1013-1018, 2001.
- CAR, B. D.; BLUE, J. T. Approaches to evaluation of bone marrow function. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia : Lea & Febiger; 1999. Cap.2, p.33-35.
- FERNANDEZ, F. R.; GRINDEM, C. B. Reticulocyte response. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap.19. p.110-116.
- HARRIS, M.T, et al Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, p.991- 998, 2004.
- JUNCOSA-MELVIN, N. et al. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gelcollagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. **Tissue Engineering**, v. 12, p.365-369, 2006.
- NIRMALANANDHAN, V. S. et al. Effects of cell seeding and collagen concentration on contraction kinetics of mesenchymal stem cell-seeded collagen constructs. **Tissue Engineering**, v.12, p. 1865-1870, 2006.
- PACINI, S. et al. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. **Tissue Engineering**, v. 13, n.12, p.2949-2955, 2007.
- SAMOTO, V. Y. Terapia celular cardíaca: vias de infusão de células mononucleares em cães s.r.d. 2006. 105f. **Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.**
- SCHMITT, I. et al., Os efeitos da radiação laser arseneto de gálio (AsGa) sobre a regeneração de tendões em cães. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 30, n.2, p. 145-149, 1993.
- TUDURY, E.A.; RAISER, A.G. Redução de fraturas distais do fêmur de cães, empregando dois pinos de Steinmann em substituição aos de Rush. **Revista Centro de Ciências Rurais**, v.15, n.2, p.141-155, 1985.
- VAZ, C.E.S. **Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos.** 2006. 109f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.