

ANA PAULA FALCI DAIBERT

**QUIMIONUCLEÓLISE CERVICAL ASSOCIADA À FENDA
VENTRAL EM CÃES: AVALIAÇÃO CLÍNICO-CIRÚRGICA,
RADIOGRÁFICA E HISTOLÓGICA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, que foi minha segunda casa durante os últimos 8 anos, e à Capes, pela concessão da bolsa que viabilizou o meu estudo.

Ao Professor Ricardo Junqueira Del Carlo, meu orientador, por ter estado sempre ao meu lado e disposto a ajudar. Obrigada por tudo... Você é maravilhoso!

À minha família que sempre acreditou e investiu em mim.

Ao Alexandre, que esteve presente em cada parte desta tese e em todas as partes da minha vida.... sem você tudo teria sido muito mais difícil.

A Betânia, Lilica e Paloma por terem sido meu braço direito esse tempo todo... vocês formam a equipe perfeita!

Aos amigos Cristina, Célber e Maíse por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores Gonzaga, Marlene e João Carlos que participaram ativamente desta tese, sempre com conselhos e observações importantes.

Aos funcionários do DVT, especialmente Maninha, Divino, Adão, Cláudio, Claudiomiro e Paulo. Vocês são incríveis!

À Rosinéia, que é uma das pessoas mais especiais que eu conheço. Nunca irei esquecer a sua ajuda.

As amigas Gyanini, Fabrícia, Luciane, Janete, Rosyane e Graciela por me ouvir e incentivar nos momentos de tristeza e alegria.

A todos aqueles que torceram por mim. Muito obrigada!

“Todas as coisas tem seu tempo e todas elas passam debaixo do céu segundo o termo que a cada uma foi prescrito. Há tempo de nascer e tempo de morrer. Há tempo de plantar. Há tempo de arrancar o que se plantou. Há tempo de matar e tempo de sarar. Há tempo de destruir e tempo de edificar. Há tempo de chorar e tempo de rir. Há tempo de afligir e tempo de dançar. Há tempo de espalhar pedras e tempo de as ajuntar. Há tempo de dar abraços e tempo de se afastar deles. Há tempo de adquirir e tempo de perder. Há tempo de guardar e tempo de lançar fora. Há tempo de rasgar e tempo de coser. Há tempo de calar e tempo de falar. Há tempo de amor e tempo de ódio. Há tempo de guerra e tempo de paz.”

Eclesiastes

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. Capítulo 1 - Quimionucleólise Cervical Associada à Descompressão Medular Cirúrgica Ventral em Cães. Aspectos Clínico-cirúrgicos e Radiográficos.	1
Resumo	1
Abstract	1
Introdução	2
Material e Métodos	5
Resultados e Discussão	9
Conclusões	12
Referências Bibliográficas	16
2. Capítulo 2 - Quimionucleólise Cervical Associada à Descompressão Medular Cirúrgica Ventral em Cães. Aspectos Histológicos.	19
Resumo	19
Abstract	19
Introdução	20
Material e Métodos	22
Resultados e Discussão	24
Conclusões	27
Referências Bibliográficas	32

LISTA DE FIGURAS**Capítulo 1:**

		Página
Figura 1	Modelo empregado na mensuração da espessura dos espaços intervertebrais nas radiografias dos animais submetidos à quimionucleólise.	8
Figura 2	Radiografias laterais da região cervical do animal dois do grupo seis antes, 24 horas e oito dias após a quimionucleólise.	13
Figura 3	Radiografias laterais da região cervical do animal dois do grupo seis 30, 60, 90 e 120 dias após a quimionucleólise.	14
Figura 4	Radiografias ventrodorsais da região cervical do animal dois do grupo seis antes, 24 horas, 60 e 120 dias após a quimionucleólise.	15

Capítulo 2:

Figura 1	Aspecto microscópico do disco intervertebral e do núcleo pulposo 24 horas após a quimionucleólise com quimiopapaína.	28
Figura 2	Aspecto microscópico do núcleo pulposo oito e 30 dias após a quimionucleólise com quimiopapaína.	29
Figura 3	Aspecto microscópico da placa terminal cartilaginosa 60 dias após a quimionucleólise com quimiopapaína e da porção do corpo vertebral adjacente a um disco tratado e do material preenchendo o espaço nuclear 90 dias após o tratamento.	30
Figura 4	Aspecto microscópico da região do disco intervertebral 120 dias após a quimionucleólise com quimiopapaína.	31

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1:

		Página
Tabela 1	Médias das espessuras dos espaços intervertebrais e dos índices de espessura dos espaços intervertebrais dos cães submetidos à quimionucleólise com quimiopapaína antes e após 24 horas, oito, 30, 60, 90 e 120 dias do procedimento.	11

RESUMO

DAIBERT, Ana Paula Falci, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2004.

“Quimionucleólise cervical associada à fenda ventral em cães: avaliação clínico-cirúrgica, radiográfica e histológica”. Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo.

Conselheiros: Luiz Gonzaga Pompermayer e João Carlos Pereira da Silva.

Foram avaliados os aspectos clínico-cirúrgicos, radiográficos e histológicos de discos intervertebrais cervicais após quimionucleólise com quimiopapaína associada à fenda ventral. Foram utilizados 24 cães separados, aleatoriamente, em seis grupos iguais e de acordo com o tempo de observação pós-operatório. A fenda ventral foi realizada na região do disco intervertebral C2-C3 e as quimionucleólises nos demais discos cervicais. Cada grupo de quatro animais foi eutanasiado por sobredose anestésica 24 horas, oito, 30, 60, 90 e 120 dias após aplicação da enzima e foram obtidos cortes sagitais dos discos intervertebrais tratados, associados a estruturas cartilaginosas e ósseas adjacentes, para análise histológica. Os cães foram também avaliados, de acordo com o grupo, clinicamente e radiograficamente por até 120 dias. Todos os cães toleraram bem o procedimento cirúrgico, não apresentando déficit neurológico, alteração do estado de consciência e dor aparente na região cervical. Na avaliação radiográfica, com 24 horas, observou-se marcada redução da espessura dos espaços intervertebrais. Do oitavo ao 90º dia, foi verificada ausência total de espaço intervertebral na região de todos os discos tratados. Aos 120 dias, entretanto, as espessuras dos espaços intervertebrais correspondiam, em média, a 59,13% da espessura anterior ao procedimento. Ainda, radiograficamente, verificou-se aos 30 dias, absorção das porções dos corpos vertebrais adjacentes aos discos tratados, que progrediu para reparação, inclusive com evidências de fusão vertebral aos 120 dias. Na avaliação histológica, 24 horas após a quimionucleólise, foi observada digestão nuclear caracterizada por cavitações e redução da intensidade de coloração pela safranina-O, indicando perda de proteoglicanos. Aos oito dias, o conteúdo nuclear apresentou-se ainda vacuolizado, contudo mais fibrilar. Aos 30 dias, foram observadas lesões e áreas de hemorragia nas placas terminais cartilaginosas. A partir do 60º dia, notou-se a presença de material amorfo no espaço

nuclear, que, aos 120 dias, tinha aparência de tecido fibrocartilaginoso. Aos 90 dias, verificou-se presença de microfraturas e osteonecrose, que estavam reparadas aos 120 dias. A quimionucleólise com quimiopapaína concomitante à fenda ventral na coluna cervical de cães determinou a lise dos discos intervertebrais, instabilidade cervical e lesões nas estruturas cartilaginosas e ósseas adjacentes, que tendem à reparação por tecido fibrocartilaginoso ao longo do tempo.

Os trabalhos apresentados como parte integrante desta tese estão seguindo as normas de publicação do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, indexada ao ISI, AGRIS, BIOSIS, CAB, CAS, MEDLARS e LILACS. ISSN 01020935.

ABSTRACT

DAIBERT, Ana Paula Falci, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2004.

“Quimionucleólise cervical associada à fenda ventral em cães: avaliação clínico-cirúrgica, radiográfica e histológica”. Adviser: Ricardo Junqueira Del Carlo.

Committee members: Luiz Gonzaga Pompermayer e João Carlos Pereira da Silva.

The present study has as objectives to evaluate the clinical-surgical, radiological and histological aspects of canine cervical intervertebral disks after chemonucleolysis with chymopapain associated to the ventral slot. For that, it was used 24 dogs randomly divided into six equal groups. The ventral slot was accomplished in the area of the intervertebral disk C2-C3 and chemonucleolysis in the other cervical disks. Each group of four animals was submitted to euthanasia with an anesthetic overdose 24 hours, eight, 30, 60, 90 and 120 days after the enzyme injection and sagittal sections of the treated disks, associated to adjacent cartilaginous endplates and bony structures were obtained for histological analysis. The dogs were also monitored clinically and radiographically for up to 120 days, according to the groups. In this study, all dogs tolerated the surgical procedure, without detectable postoperative pain, neurological deficit or alteration of the conscience state. In the radiographic evaluation, it was observed consistent disk space narrowing 24 hours after the procedure and total absence of space from the eighth to the 90th day after chemonucleolysis in the area of all treated disks. However, at 120 days of postoperative there was an increase in disk height, corresponding, on average, to 59.13% of the preinjection value. Also, on the 30th day of postoperative, it was noted absorption of the vertebral bodies adjacent to the treated disks that progressed to healing, with evidences of vertebral fusion 120 days after the treatment. In the histological evaluation, it was observed 24 hours after disk injection nuclear digestion, characterized by cavitations and decrease of safranin-O staining intensity, indicating loss of proteoglycans. At eight days, the nuclear content was still vacuolated but more fibrillar. At 30 days, it was noted lesions and hemorrhage in the cartilaginous endplates. An irregularly defined mass in the nuclear space was observed on days 60th and 90th, but it seemed fibrocartilaginous tissue on day 120th. It was also observed

microfractures and bone necrosis on day 90th, which were healed by day 120th. Chemonucleolysis with chymopapain associated to the ventral slot in the cervical column of dogs determines lysis of intervertebral disks, cervical instability and lesions of cartilaginous and bone adjacent structures that tend to repair with fibrocartilaginous tissue along the time.

CAPÍTULO 1. QUIMIONUCLEÓLISE CERVICAL ASSOCIADA À FENDA VENTRAL EM CÃES: AVALIAÇÃO CLÍNICO-CIRÚRGICA E RADIOGRÁFICA.

RESUMO

Foram avaliados os aspectos clínico-cirúrgicos e radiográficos dos discos intervertebrais cervicais após quimionucleólise com quimiopapaína associada à fenda ventral, em 24 cães separados, aleatoriamente, em seis grupos de quatro animais. Em todos foi realizada a fenda ventral na região do disco intervertebral C2-C3 e quimionucleólises nos demais discos cervicais. Os cães foram monitorados clínica e radiograficamente por até 120 dias. Todos toleraram bem o procedimento cirúrgico, não apresentando déficit neurológico, alteração do estado de consciência e dor aparente na região cervical. Na avaliação radiográfica, observou-se marcada redução da espessura dos espaços intervertebrais 24 horas após o tratamento. Do oitavo ao 90º dia após aplicação da enzima, foi verificada ausência total de espaço intervertebral na região dos discos tratados. Aos 120 dias, as espessuras dos espaços intervertebrais corresponderam, em média, a 59,13% da espessura anterior ao procedimento. Aos 30 dias, também ocorreu reabsorção óssea dos corpos vertebrais adjacentes aos discos tratados, que progrediu para cicatrização, inclusive com evidências de fusão vertebral aos 120 dias. A quimionucleólise dos discos intervertebrais C3-C4 a C6-C7 concomitante à fenda ventral de C2-C3 determina, além da lise dos discos intervertebrais tratados, instabilidade cervical, destruição das placas terminais cartilaginosas e das porções dos corpos vertebrais adjacentes, que tendem à reparação ao longo do tempo.

Palavras-chave: quimionucleólise, quimiopapaína, coluna cervical, cão.

ABSTRACT

The present study has as objectives to evaluate the clinical-surgical and radiological aspects of chemonucleolysis with chymopapain in canine cervical intervertebral disks associated to the ventral slot. For that, it was used 24 dogs randomly divided into six groups of four animals. The ventral slot was accomplished in the area of the intervertebral

disk C2-C3 and chemonucleolysis in the other cervical disks. The dogs were monitored clinically and radiographically for up to 120 days. In this study, all dogs tolerated the surgical procedure, without detectable postoperative pain, neurological deficit or alteration of the conscience state. In the radiographic evaluation, it was observed consistent disk space narrowing 24 hours after the procedure and total absence of space from the eighth to the 90th day of postoperative in the area of all treated disks. However, 120 days of postoperative there was an increase in disk height, corresponding, on average, to 59.13% of the preinjection value. On the 30th day of postoperative, it was noted bone absorption of the vertebral bodies adjacent to the treated disks that progressed to healing, with evidences of vertebral fusion 120 days after the treatment. It can be concluded that chemonucleolysis of the intervertebral disks C3-C4 to C6-C7 concomitant to the ventral slot of C2-C3 determines lysis of the treated disks, cervical instability, and destruction of the cartilaginous endplates and of portions of the adjacent vertebral bodies that tend to the repair along the time.

Keywords: Chemonucleolysis, chymopapain, cervical column, dog.

INTRODUÇÃO

As herniações discais são mais frequentemente observadas nas regiões cervical, torácica caudal e lombar, mas podem ocorrer em qualquer disco intervertebral, sendo as discopatias cervicais responsáveis por aproximadamente 15% de todas as doenças de disco intervertebral canino (LeCouteur e Child, 1997). As lesões de disco cervical ocorrem mais comumente em C2-C3 e o envolvimento decresce progressivamente de C3-C4 a C7-T1 (Toombs e Bauer, 1998).

Russell e Griffiths (1968) relataram a recorrência dos sinais clínicos em 36% de 110 cães tratados com métodos conservadores. O tratamento cirúrgico está indicado nos casos de dor persistente ou déficits neurológicos moderados a severos (Coates, 2000). Dentre as opções cirúrgicas, os procedimentos mais realizados na coluna cervical são a fenda ventral (descompressão ventral) e a fenestração (Wheller e Sharp, 1999).

Atualmente, preconiza-se a associação de procedimentos profiláticos e terapêuticos nas discopatias cervicais em cães, sendo geralmente empregada a fenda ventral terapêutica

na região do disco intervertebral herniado associada à fenestração ventral profilática dos discos intervertebrais adjacentes (Coates, 2000). Pois, segundo Jensen e Arnbjerg (2001), quando um determinado disco intervertebral sofre herniação, todos os demais discos daquela região também estão em processo degenerativo e poderão sofrer herniações futuramente.

A fenda ventral é considerada a técnica ideal por permitir a remoção de material discal do interior do canal vertebral, mas requer a identificação acurada do disco envolvido e é de difícil realização (Wheeler e Sharp, 1999; Coates, 2000). Além disso, está associada a risco de instabilidade e colapso vertebral (Fitch et al., 2000; Lemarie et al., 2000; Chen et al., 2001). Segundo Coates (2000), a mínima dissecação muscular e a possibilidade de execução da fenestração profilática dos discos intervertebrais cervicais adjacentes são vantagens da fenda ventral.

A fenestração é um procedimento cirúrgico controverso. Apesar de alguns autores reconhecerem sua utilidade no tratamento e profilaxia de discopatias (Harari e Marks, 1992; Nakama et al., 1993), outros relatam piora do quadro neurológico após seu uso (Tomlinson, 1985; Macy et al., 1999). É unânime que a fenestração não é capaz de remover o material discal presente no canal vertebral, contudo, permite a remoção do conteúdo do núcleo pulposo degenerado, impedindo sua futura herniação (Harari e Marks, 1992; Nakama et al., 1993). Segundo Bartels et al. (1983), existe risco de material proveniente do disco intervertebral ser forçado para o interior do canal medular durante a fenestração e causar compressão medular. Além disso, a instabilidade resultante do procedimento não justifica qualquer benefício advindo da técnica (Macy et al., 1999).

A quimionucleólise é técnica alternativa à cirurgia convencional e é definida como a dissolução do núcleo pulposo de um disco intervertebral pela administração de composto que causa a sua decomposição química (Bradford et al., 1983). O termo foi estabelecido por Smith (1969) e sinônimos incluem discólise e nucleólise intradiscal (Fry e Johnson, 1991).

A quimiopapaína é a principal enzima quimionucleolítica. Seu substrato são os proteoglicanos, que juntamente com a água e o colágeno, são os principais constituintes do núcleo pulposo. Ela é ativa apenas durante as primeiras horas após administração no disco intervertebral e sua ação resulta em digestão da proteína central da molécula de proteoglicanos, fragmentando-os em cadeias laterais. Os proteoglicanos são altamente

hidrofílicos e quando lisados, perdem essa característica, resultando em perda do conteúdo de água do núcleo pulposo e, conseqüentemente, em redução do volume e da pressão intradiscal (Fry e Johnson, 1991). Na avaliação radiográfica, a redução da espessura do espaço intervertebral observada após a quimionucleólise é a manifestação física desse fenômeno (Nitobe et al., 1988).

Tem sido demonstrado que a quimiopapaína degrada os proteoglicanos, mas possui pequeno ou nenhum efeito sobre o colágeno discal (Nitobe et al., 1988). Segundo Smith (1993), caso a enzima escape para o espaço epidural, após a administração no disco intervertebral, ela não penetra a dura-máter, que é colagenosa, e também não afeta as raízes nervosas cobertas por prolongamentos dessa meninge. Contudo, causará sangramento onde encontrar microcirculação, pois as células capilares são unidas por proteoglicanos. Vasos mais calibrosos do que os capilares não sofrem colapso devido à presença de colágeno em suas paredes. De acordo com Pinkowski e Leeson (1990), a quimiopapaína é inativada por alfa-macroglobulinas, o que previne sua atividade proteolítica fora do disco intervertebral.

A redução de volume do disco intervertebral resulta em diminuição da pressão sobre a medula espinhal e nervos espinhais associados, aliviando os sinais de dor discogênica. A redução do tamanho do fragmento herniado também podem ser razões para a resposta positiva ao tratamento (Fry e Johnson, 1991).

As principais contra-indicações da quimionucleólise são a existência de fragmento discal seqüestrado, pois a enzima não consegue atingi-lo por impedimento físico; os casos em que o material herniado originar do anel fibroso, pois a enzima não degrada proteínas colágenas, e nos pacientes com estenose espinhal (Nordby et al., 1996). Além disso, existe risco de anafilaxia (Pinkowski e Leeson, 1990).

O grau de destruição dos proteoglicanos da matriz do núcleo pulposo e a magnitude da redução da espessura do espaço intervertebral na avaliação radiográfica é dose dependente (Lü et al., 1997). De acordo com Nitobe et al. (1988), o efeito da quimiopapaína no núcleo pulposo é reversível e o disco reconstituído restabelece sua função de absorção de choques, o que não ocorre após a cirurgia convencional. As características da biossíntese de proteoglicanos do núcleo pulposo sugerem que o processo de regeneração é similar ao da cartilagem. A origem das células do núcleo pulposo regenerado ainda é incerta, contudo há evidências que sejam oriundas do anel fibroso.

Leivseth et al. (1999), após estudo retrospectivo em 51 pacientes submetidos à quimionucleólise com quimiopapaína, afirmaram que discos intervertebrais lombares humanos não regeneram, o que contrasta com os resultados obtidos em modelos experimentais animais.

Na análise radiográfica, a redução da espessura do espaço intervertebral é observada a partir de 24 horas da quimionucleólise e atinge o máximo aos oito dias após o tratamento. Posteriormente, a espessura vai gradualmente aumentando, dependendo da dose da enzima utilizada (Bradford et al., 1983; Atiola et al., 1988; Nitobe et al., 1988; Sugimura et al., 1996).

De acordo com Kudo et al. (1993), a dose terapêutica ideal da quimiopapaína para redução da pressão intradiscal em cães é 10,0 mg (50 U). Já, para Bradford et al. (1983), a dose de 5,3 U é mais adequada por permitir o restabelecimento de 50 a 66% da espessura do espaço intervertebral três meses após o tratamento.

Este trabalho tem por objetivos avaliar os aspectos clínico-cirúrgicos e radiográficos da quimionucleólise com quimiopapaína em discos intervertebrais cervicais caninos associada à fenda ventral, caracterizando a associação de um procedimento profilático (quimionucleólise) com um terapêutico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 24 cães adultos, clinicamente sadios, sem raça definida, machos e fêmeas, pesando entre 10 e 20 kg, provenientes do canil experimental do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Todos os animais foram submetidos a exame radiográfico da coluna cervical, que constou de radiografias simples nas projeções lateral (Fig. 2A) e ventrodorsal (Fig. 4A) e de mielografia (Fig. 2B), com a finalidade de descartar presença de compressão medular prévia. Para a realização da mielografia, foi utilizado como agente contrastante iohexol¹ na dose de 0,3 mL/kg.

Os animais foram submetidos a jejum por 12 horas, anestesiados de forma rotineira e posicionados em decúbito dorsal sobre calha, com a região cervical média apoiada em

¹ Omnipaque 300 mg I/ml – Nycomed Ireland Ltd

almofada, permitindo o alinhamento das vértebras cervicais. Os membros torácicos foram tracionados caudalmente e fixados. Foi utilizada fita adesiva para fixação da cabeça e tórax dos animais à mesa, evitando-se movimentos laterais. Após preparo do campo cirúrgico, a pele e a fáscia superficial foram incisadas na linha média, a partir da cartilagem tireóide até o manúbrio esternal, permitindo a dissecação dos músculos esternocefálicos e esternohióideos em sua rafe mediana, expondo a traquéia. O conjunto composto pela traquéia, esôfago, nervo laringo-recorrente e bainha carotídea foi afastado lateralmente à esquerda e as inserções dos músculos longos do pescoço no processo ventral das vértebras foram identificadas. Um afastador auto-estático de Gelpi foi aplicado para manter a exposição das estruturas anatómicas desejadas. Os discos intervertebrais cervicais foram identificados a partir da palpação dos proeminentes processos transversos (asas) do atlas (C1). Após isso, foi realizada a técnica da fenda ventral na região do disco intervertebral C2-C3. Para isso, os músculos longos do pescoço inseridos nas vértebras C2 e C3 foram afastados lateralmente com o auxílio de uma rugina, permitindo a visualização do disco intervertebral C2-C3, bem como das regiões caudal e cranial das vértebras C2 e C3, respectivamente. O processo ventral da vértebra C2 foi removido com pinça goiva e uma fenda óssea envolvendo, no máximo, 50% da largura e 33% do comprimento das vértebras C2 e C3, respectivamente, foi realizada por meio de uma perfuratriz elétrica, na velocidade de 5000 rpm. A profundidade foi a espessura completa do corpo vertebral até possibilitar a visualização da medula espinhal no canal vertebral.

Após realização da fenda ventral, foi realizada a quimionucleólise nos demais discos intervertebrais cervicais (C3-C4 a C6-C7). Para isso, os músculos longos do pescoço foram afastados lateralmente na região dos discos intervertebrais, ou seja, imediatamente caudal aos processos ventrais de C3, C4, C5 e C6, determinando mínimas lesões ao restante da musculatura. Dessa forma, as bordas ventrais dos discos intervertebrais foram visualizadas permitindo a inserção adequada das agulhas. Foi administrado em cada disco intervertebral exposto, 4,8 mg (5,3 U) de quimiopapaína² (1,1 U/mg) reconstituída em 0,1 mL de solução tampão, 0,10 molar de fosfato de sódio, pH 6,5, contendo 0,05 molar de EDTA e 0,01 molar de cisteína. Após a administração da enzima, a seringa foi mantida na posição de injeção por um minuto e o conteúdo de refluxo foi reinjetado. Ao final dos

² Chymopapain 250U - Sigma

procedimentos, os músculos longos do pescoço e os esterno-hióideos foram aproximados com fio absorvível em pontos simples contínuos. O tecido subcutâneo e a pele foram suturados com fio inabsorvível, em pontos tipo simples contínuo e Wolff, respectivamente.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (G) de quatro animais, sendo que cada grupo correspondeu a um período de avaliação pós-operatória. Dessa forma, os animais foram avaliados clínica e radiograficamente durante 24 horas após a cirurgia (G1), oito dias (G2), 30 dias (G3), 60 dias (G4), 90 dias (G5) e 120 dias (G6).

Após a cirurgia, guardadas as peculiaridades de cada grupo com relação ao tempo de observação, os cães foram mantidos em canis individuais por 10 dias e, ao final deste período, foram transferidos para canis coletivos (quatro cães/canil). No pós-operatório, os animais foram medicados com enrofloxacina³ (10 mg/kg por via subcutânea), a cada 24 horas durante cinco dias, e cetoprofeno⁴ (1,1 mg/kg por via subcutânea), a cada 24 horas durante três dias. Além disso, permaneceram com colar cervical confeccionado de espuma até a retirada dos pontos, que aconteceu no 10º dia do pós-operatório. O exame clínico dos animais foi realizado diariamente até o fim do período de observação de cada grupo, e constou da avaliação do estado geral, da consciência, da deambulação, da postura e da observação da presença de dor à palpação cervical e à flexão, extensão e lateralização do pescoço.

Os animais foram submetidos a exames radiográficos simples, nas projeções lateral e ventrodorsal, 24 horas (G1, G2, G3, G4, G5 e G6), oito dias (G2, G3, G4, G5 e G6), 30 dias (G3, G4, G5 e G6), 60 dias (G4, G5 e G6), 90 dias (G5 e G6) e 120 dias (G6) após o procedimento cirúrgico, com a finalidade de monitorar as variações da espessura dos espaços intervertebrais correspondentes aos discos submetidos à quimionucleólise bem como para a verificação de alterações nas vértebras adjacentes aos discos intervertebrais tratados.

Para fins de comparação e para evitar interferências do tamanho do animal na espessura do espaço intervertebral foi estabelecido um índice de espessura do espaço intervertebral (IEIV) por meio de medidas obtidas nas avaliações radiográficas de cada animal, calculadas e expressas da seguinte maneira:

³ Duotril 10% - Duprat

⁴ Profenid injetável - Aventis

- **Índice de Espessura do Espaço Intervertebral (IEIV) = $\frac{BC + EF}{AB + DE}$**

Onde BC e EF são as espessuras ventral e dorsal, respectivamente, do espaço intervertebral e AB e DE os comprimentos ventral e dorsal, respectivamente, do corpo vertebral imediatamente cranial ao espaço intervertebral sob exame (Fig. 1). A porcentagem de redução do espaço intervertebral foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

- **% de redução do EIV = $\frac{\text{IEIV após a quimionucleólise}}{\text{IEIV antes da quimionucleólise}} \times 100$**

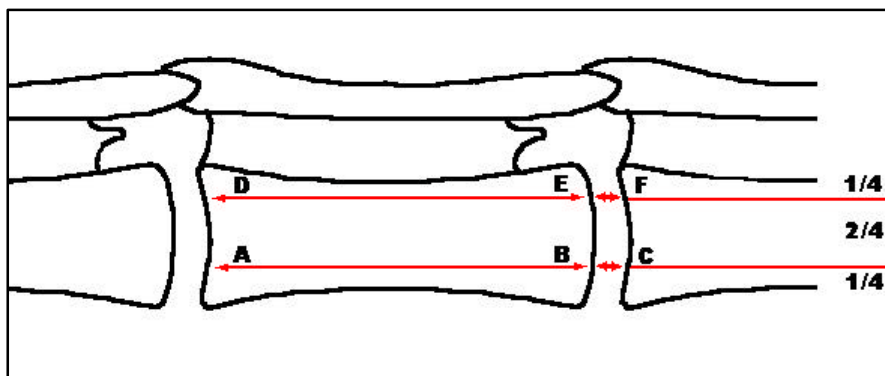


Figura 1. Modelo empregado na mensuração da espessura dos espaços intervertebrais nas radiografias dos animais submetidos à quimionucleólise. BC e EF são as espessuras ventral e dorsal do disco intervertebral, enquanto AB e DE são os comprimentos ventral e dorsal do corpo vertebral imediatamente cranial ao disco examinado (adaptado de Lü et al, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas quimionucleólises em 96 discos intervertebrais cervicais (C3-C4 a C6-C7) e em todos os animais, na região do disco intervertebral C2-C3, foi feita a fenda ventral (Figuras 2A e 4B). Este protocolo experimental foi adotado porque as lesões de disco cervical, em cães, ocorrem mais comumente em C2-C3 e a incidência decresce progressivamente de C3-C4 a C7-T1 (Toombs e Bauer, 1998). Portanto, foi realizado o procedimento terapêutico mais freqüentemente preconizado (fenda ventral) no disco intervertebral de maior incidência da doença associado à técnica profilática em estudo nos demais discos do segmento cervical.

Como previamente relatado por Atiola et al. (1988), o acesso cirúrgico para a realização da quimionucleólise permitiu a administração adequada da enzima nos discos intervertebrais, minimizando o risco de injeção intratecal inadvertida, o que causaria aumento da pressão intracraniana e destruição das junções endoteliais levando à hemorragia e edema. O acesso cirúrgico ventral também eliminou a chance de penetração acidental da artéria ventral ou de raízes nervosas, bem como permitiu a realização da fenda ventral concomitantemente.

Devido ao fato da quimionucleólise ter sido realizada em discos intervertebrais radiograficamente normais, sempre foi encontrada resistência à injeção da quimiopapaína, como também já relatado por Atiola et al. (1988). Após a administração da enzima, houve refluxo, para o interior da seringa, de um material de aspecto branco e gelatinoso, que foi reinjetado, assegurando a administração da dose completa. Segundo Bradford et al. (1983), o conteúdo do refluxo é o núcleo pulposo, indicando que o disco tratado encontrava-se sob compressão normal (sem fissuras ou rupturas).

Neste estudo, a realização da fenda ventral bem como da quimionucleólise nos discos intervertebrais cervicais determinaram complicações pós-operatórias insignificantes. Todos os cães toleraram bem o procedimento cirúrgico, não apresentando déficit neurológico, alteração do estado de consciência e dor aparente na região cervical no pós-operatório. Foi possível flexionar e lateralizar o pescoço de todos os animais logo no primeiro dia pós-cirúrgico sem a manifestação de dor, contudo dois animais não permitiram a extensão do pescoço nas primeiras 48 horas após o procedimento. Não foram observadas

alterações na postura e deambulação dos animais nos primeiros 30 dias de pós-operatório. A partir desta data, todos os animais apresentaram tendência a manter o pescoço discretamente flexionado, contudo sem manifestação de dor durante a palpação e manipulação cervical. Observou-se também aumento progressivo da rigidez da região cervical, evidenciada pela menor amplitude de extensão, flexão e lateralização do pescoço.

Ao contrário do relatado por Atiola et al. (1988), todos os animais foram capazes de ingerir ração peletizada seca logo após a recuperação anestésica. Também não apresentaram nenhuma alteração da ingestão hídrica, micção e defecação durante o período experimental.

Na análise radiográfica, observou-se uniformidade dos resultados após a quimionucleólise. O IEIV pré-operatório médio foi 0,0691, e 24 horas após a quimionucleólise diminuiu para 0,0295. Ou seja, a porcentagem média de redução das espessuras dos espaços intervertebrais 24 horas após o tratamento foi 57,25% (Tab. 1/ Fig. 2C). Esse resultado corrobora o relatado por Atiola et al. (1988), que observou maior redução da espessura dos espaços intervertebrais logo nas primeiras 24 horas após a quimionucleólise.

Aos oito dias de pós-operatório, os espaços intervertebrais estavam ausentes em todas as avaliações radiográficas (Fig. 2D). Portanto, os IEIVs calculados foram iguais a zero, indicando 100% de redução da espessura dos espaços intervertebrais. Não há relatos de redução total da espessura de espaço intervertebral após quimionucleólise com quimiopapaína na literatura. Os autores (Bradford et al., 1983; Atiola et al., 1988; Nitobe et al., 1988; Sugimura et al., 1996) mencionam apenas redução marcada da espessura entre uma e duas semanas após o procedimento. Segundo Nitobe et al. (1988), houve redução de 46,8% da espessura do espaço intervertebral após uma semana da realização da quimionucleólise. Isso sugere que a realização concomitante da fenda ventral foi um fator de instabilidade importante que pode ter determinado maior degeneração discal.

Aos 30, 60 e 90 dias, a análise das radiografias indicou a manutenção da ausência de espaço intervertebral nas regiões dos discos tratados, de forma idêntica ao observado aos oito dias (Fig. 3A, 3B e 3C). Contudo, 120 dias após a quimionucleólise observou-se retorno da espessura dos espaços intervertebrais (Fig. 3D). Nas radiografias referentes a esse período de observação a média dos IEIVs foi de 0,0408. Isso significa que, quatro

meses após a realização da quimionucleólise, a espessura dos espaços intervertebrais correspondiam, em média, à 59,13% da espessura anterior ao procedimento. Estes resultados estão de acordo com Bradford et al. (1983), que concluiu que o efeito da quimiopapaína é parcialmente reversível e que a reconstituição do núcleo pulposo pode ocorrer com o tempo. Por outro lado, a reconstituição dos núcleos pulposos, neste estudo, ocorreu de forma retardada em relação ao já descrito. Nitobe et al. (1988) relataram que a espessura dos espaços intervertebrais, 60 dias após a quimionucleólise, correspondia a 76,6% da pré-tratamento. De forma semelhante, Kudo et al. (1993), relataram recuperação de 61,1% da espessura dos espaços intervertebrais três meses após da realização da quimionucleólise utilizando quimiopapaína na dose de 5,0 U.

É possível inferir que o menor espaço intervertebral em relação ao tempo de observação, quando comparadas as análises desse experimento com os resultados dos autores citados, sugere que a instabilidade extra resultante da realização da fenda ventral causou maior degeneração discal bem como retardou o processo de reparação dos discos intervertebrais tratados.

Tabela 1. Média das espessuras dos espaços intervertebrais (EIV) e dos índices de espessura dos espaços intervertebrais (IEIV) dos cães submetidos a quimionucleólise com quimiopapaína antes e após 24 horas (24h), oito dias (8d), 30 dias (30d), 60 dias (60d), 90 dias (90d) e 120 dias (120d) do procedimento.

	Antes	24h	8d	30d	60d	90d	120d
IEIV	0,0691	0,0295	0	0	0	0	0,0408
% REIV[§]	-	57,25	100	100	100	100	40,87

[§] Porcentagem de redução média dos IEIVs pós-tratamento em relação ao pré-tratamento.

Apesar de Fry e Johnson (1991) terem observado numerosos defeitos nas placas terminais cartilagenosas, um mês após a realização da quimionucleólise em cães, não há relatos na literatura de alterações radiográficas nas estruturas ósseas adjacentes aos discos intervertebrais, ao contrário dos achados do presente estudo.

Em todos os animais tratados, foi observado, aos 30 dias de pós-operatório, absorção óssea de regiões dos corpos vertebrais adjacentes aos discos tratados (Fig. 3A).

Essa absorção foi caracterizada, radiograficamente, por redução da radiopacidade nessas áreas. Aos 60 dias de pós-operatório foi possível observar início do processo de reparação óssea, caracterizado por aumento da radiopacidade nas áreas afetadas, que foi além do contorno natural das vértebras (Fig. 3B). Aos 90 e 120 dias, verificou-se progressão da radiopacidade, de forma irregular, inclusive com evidências de fusão, o que pode justificar a progressiva redução da amplitude dos movimentos do pescoço dos animais avaliados (Fig. 3C e 3D). Essas alterações sugerem que o atrito anormal entre os corpos vertebrais em virtude da degeneração discal resultou na destruição das placas terminais cartilaginosas e conseqüente reação óssea. É importante enfatizar que a recuperação da espessura dos espaços intervertebrais, observada radiograficamente, 120 dias após a quimionucleólise coincide com a fusão dos corpos vertebrais submetidos a fenda ventral, proporcionando estabilidade e conseqüente reparação dos discos (Figuras 4B, 4C e 4D).

CONCLUSÕES

A quimionucleólise dos discos intervertebrais C3-C4 a C6-C7 concomitante à fenda ventral de C2-C3 é um procedimento exequível, mas que deve ser utilizado com cautela pois determina, além da destruição dos discos intervertebrais tratados, instabilidade cervical, destruição das placas terminais cartilaginosas e das porções dos corpos vertebrais adjacentes, que tendem à reparação ao longo do tempo.

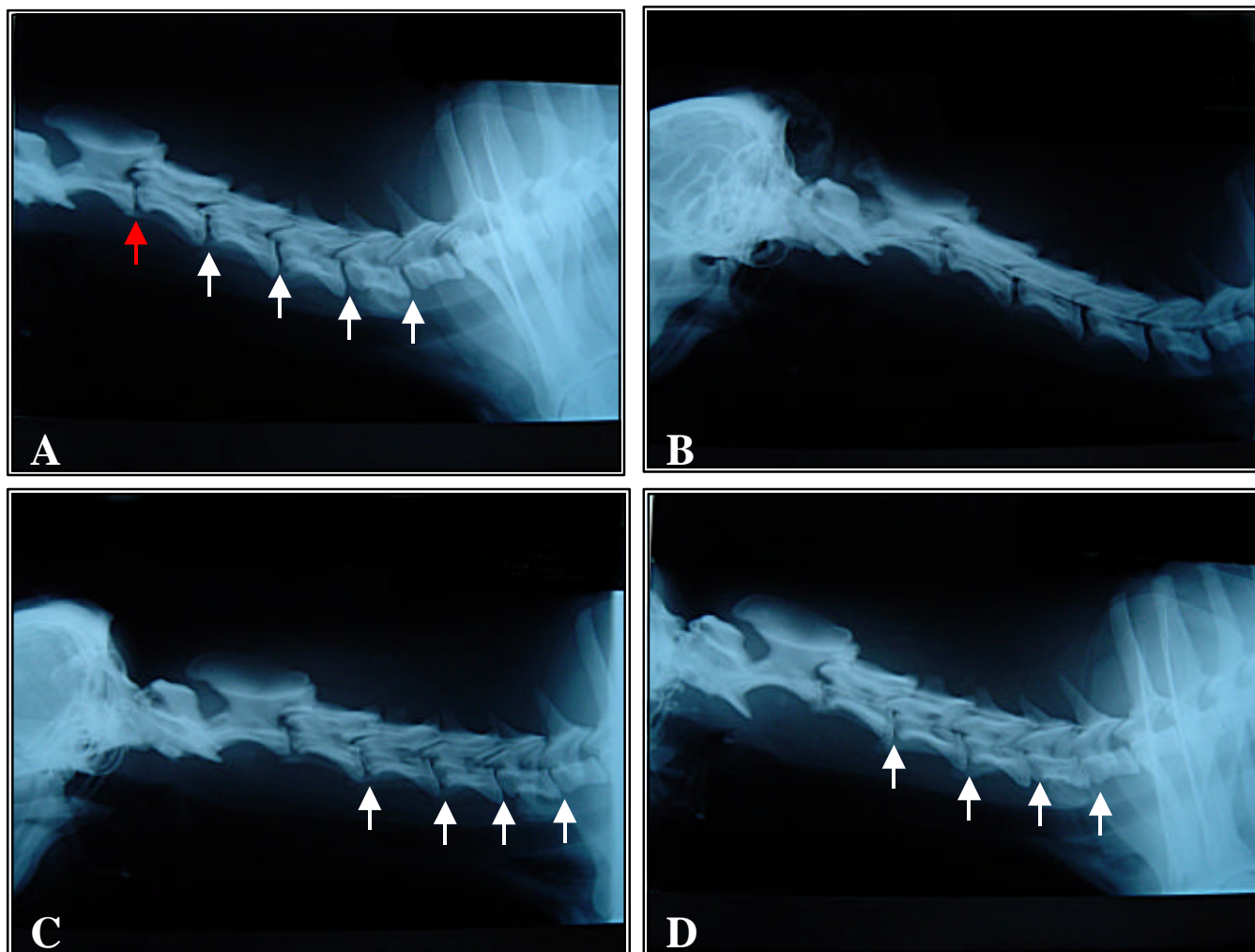


Figura 2. Radiografias laterais da região cervical do animal dois do grupo seis. A. Pré-operatório. Espaço intervertebral C2-C3, correspondente à região onde foi realizada a fenda ventral (seta vermelha). Espaços intervertebrais C3 a C7, correspondentes aos discos submetidos a quimionucleólises (setas brancas); B. Mielografia. Agente contrastante no espaço subaracnóide cervical; C. 24 horas após a quimionucleólise. Redução das espessuras dos espaços intervertebrais correspondentes aos discos tratados (setas); D. Oito dias após a quimionucleólise. Ausência dos espaços intervertebrais correspondentes aos discos tratados (setas).

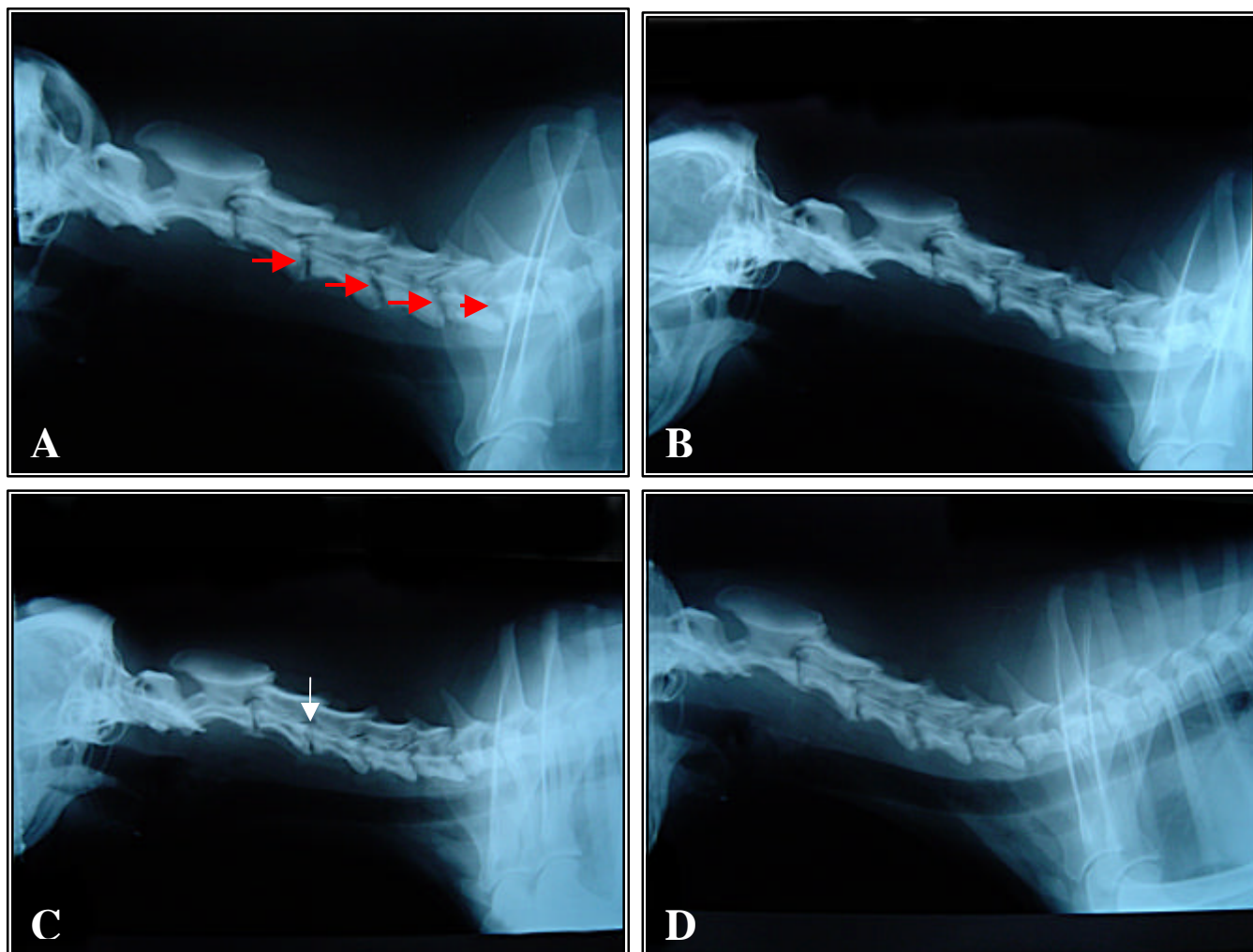


Figura 3. Radiografias laterais da região cervical do animal dois do grupo seis. A. 30 dias após a quimionucleólise. Ausência dos espaços intervertebrais correspondentes aos discos tratados e absorção óssea de regiões dos corpos vertebrais adjacentes aos discos, caracterizada por diminuição da radiopacidade (setas); B. 60 dias após a quimionucleólise. Início do processo de reparação óssea, caracterizado por aumento discreto da radiopacidade nas áreas afetadas; C. 90 dias após a quimionucleólise. Progressão da radiopacidade, de forma irregular, com evidências de fusão (seta); D. 120 após a quimionucleólise. Aumento da espessura dos espaços intervertebrais correspondentes aos discos tratados.

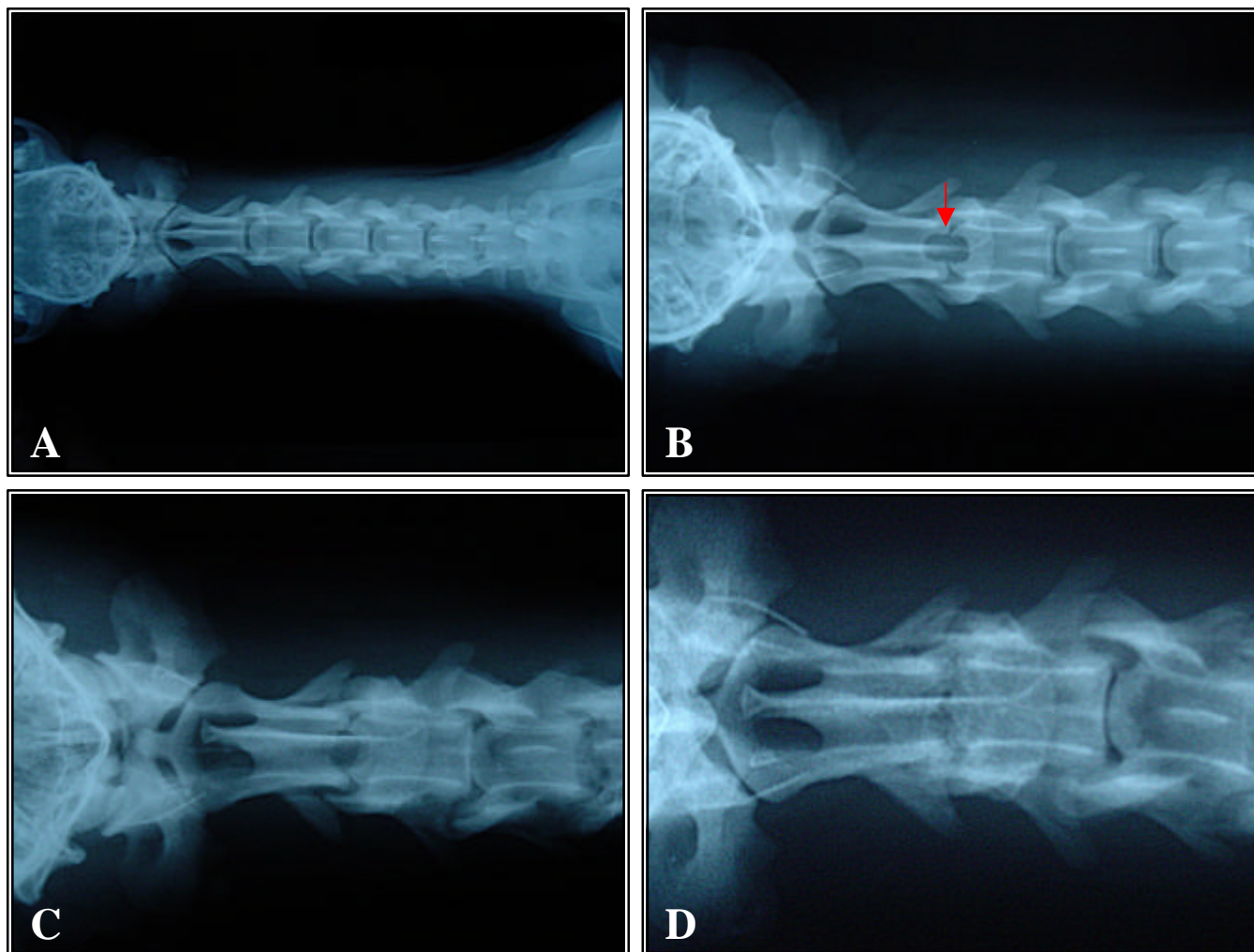


Figura 4. Radiografias ventrodorsais da região cervical do animal dois do grupo seis. A. antes da quimionucleólise; B. 24 horas após o procedimento. Falha óssea (fenda ventral) realizada entre os corpos vertebrais C2-C3 (seta); C. 60 dias após o procedimento. Aumento da radiopacidade na região da falha; D. 120 dias após o procedimento. Fusão das vértebras C2 e C3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATIOLA, M.A.; BAILEY, C.S.; MORGAN, J.P. Cervical chemonucleolysis in the dog. A surgical technique. **Veterinary Surgery**, v.17, n.3, p.135-140, 1988.

BARTELS, K.E.; CREED, J.E.; YTURRASPE, D.J. Complications associated with the dorsolateral muscle separating approach for thoracolumbar disk fenestration in the dog. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.183, n.10, p.1081-1083, 1983.

BRADFORD, D.S.; COOPER, K.M.; OEGEMA, T.R. Chymopapain, chemonucleolysis and nucleus pulposus regeneration. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.65-A, n.9, p.1220-1231, 1983.

CHEN, T.; CRAWFORD, N.R.; SONNTAG, V.K.H. et al. Biomechanical effects of progressive anterior cervical decompression. **Spine**, v.26, n.1, p.6-14, 2001.

COATES, J.R. Intervertebral disk disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.30, n.1, p.77-110, 2000.

FITCH, R.B.; KERWIN, S.C.; HOSGOOD, G. Caudal cervical intervertebral disk disease in the small dog: Role of distraction and stabilization in ventral slot decompression. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.36, p.68-74, 2000.

FRY, T.R.; JOHNSON, A.L. Chemonucleolysis for treatment of intervertebral disk disease. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.199, n.5, p.622-627, 1991.

HARARI, J.; MARKS, S.L. Surgical treatments for intervertebral disc disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.22, n.4, p.899-915, 1992.

JENSEN, V.F.; ARNBJERG, J. Development of intervertebral disk calcification in the dachshund: a prospective longitudinal study. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.37, p.274-282, 2001.

KUDO, T.; SUMI, A.; HASHIMOTO, A. Experimental chemonucleolysis with chymopapain in canine intervertebral disks. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.55, n.2, p.211-215, 1993.

LECOUTEUR, R.A.; CHILD, G. Afecções da medula espinhal. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole. 1997. p.890-980.

LEIVSETH, G.; SALVESEN, R.; HEMMINGHYTT, S. et al. Do human lumbar discs reconstitute after chemonucleolysis? **Spine**, v.24, n.4, p.342-348, 1999.

LEMARIE, R.J.; KERWIN, S.C., PARTINGTON, B.P. et al. Vertebral subluxation following ventral cervical decompression in the dog. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.36, n.4, p.348-358, 2000.

LÜ, D.S.; SHONO, Y.; ODA, I. et al. Effects of chondroitinase ABC and chymopapain on spinal motion segment biomechanics. Av in vivo biomechanical, radiologic, and histologic canine study. **Spine**, v.22, n.16, p.1828-1834, 1997.

MACY, N.B. CLIFFORD, M.L.; STOVER, S.M. et al. Effect of disk fenestration on saggital kinematics of the canine C5-C6 intervertebral space. **Veterinary Surgery**, v.28, n.2, p.171-179, 1999.

NAKAMA, S. TAURA, Y. TABARU, H.; et al. A retrospective study of ventral fenestration for disk disease in dogs. **Journal of Veterinary Science**, v.55, n.5, p.781-784, 1993.

NITOBÉ, T.; HARATA, S.; OKAMOTO, Y. et al. Degradation and biosynthesis of proteoglycans in the nucleus pulposus of canine intervertebral disc after chymopapain treatment. **Spine**, v.13, n.11, p.1332-1339, 1988.

NORDBY, E.J.; FRASER, R.D.; FRACS, J. et al. Spine update chemonucleolysis. **Spine**, v.21, n.9, p.1102-1105, 1996.

PINKOWSKI, J.L.; LEESON, M.C. Anaphylactic shock associated with chymopapain skin test. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.260, p.186-190, 1990.

RUSSEL, S.W.; GRIFFITHS, R.C. Recurrence of cervical disc syndrome surgically and conservatively treated dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.153, n.22, p.1412-1417, 1968.

SMITH, L. Chemonucleolysis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n.67, p.72-80, 1969.

SMITH, L. Chemonucleolysis – Personal history, trials and tribulations. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.287, p.117-124, 1993.

SUGIMURA, T.; KATO, F.; MIMATSU, K. et al. Experimental chemonucleolysis with chondroitinase ABC in monkeys. **Spine**, v.21, n.2, p.161-165, 1996.

TOMLINSON, J. Tetraparesis following cervical disk fenestration in two dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.187, n.1, p.76-77, 1985.

TOOMBS, J.P.; BAUER, M.S. Afecção do disco intervertebral. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole. 1998. p.1286-1305.

WHEELER, S.J.; SHARP, N.J.H. **Diagnóstico e tratamento cirúrgico das afecções espinhais do cão e do gato**. São Paulo: Manole. 1999. p.68-84.

CAPÍTULO 2. QUIMIONUCLEÓLISE CERVICAL ASSOCIADA À FENDA VENTRAL EM CÃES: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.

RESUMO

Foram avaliados os aspectos histológicos dos discos intervertebrais cervicais após quimionucleólise com quimiopapaína associada à fenda ventral, em 24 cães separados, aleatoriamente, em seis grupos iguais. A fenda ventral foi realizada na região dos discos intervertebrais C2-C3 e a quimionucleólise nos demais discos cervicais. Os cães foram eutanasiados 24 horas, oito, 30, 60, 90 e 120 dias após aplicação da enzima, permitindo obtenção de cortes sagitais dos discos intervertebrais tratados, associados a estruturas cartilaginosas e ósseas adjacentes. Às 24 horas foi observada digestão nuclear caracterizada por cavitações e redução da intensidade de coloração pela safranina-O, indicando perda de proteoglicanos. Aos oito dias, o núcleo apresentou-se ainda vacuolizado, contudo mais fibrilar. Aos 30 dias, lesões e áreas de hemorragia nas placas terminais cartilaginosas foram observadas. A partir do 60º dia, havia material amorfo no espaço nuclear, que, aos 120 dias, tinha aparência fibrocartilaginosa. Aos 90 dias, verificou-se presença de microfraturas e osteonecrose, que aos 120 dias estavam reparadas. A quimionucleólise associada a fenda ventral determinou a lise do disco intervertebral e lesões nas estruturas cartilaginosas e ósseas adjacentes, com tendência à reparação por tecido fibrocartilaginoso.

Palavras-chave: quimionucleólise, quimiopapaína, coluna cervical, cão.

ABSTRACT

It was evaluated the histological aspects of canine cervical intervertebral disks after chemonucleolysis with chymopapain associated to the ventral slot. For that, it was used 24 dogs randomly divided into six equal groups. The ventral slot was accomplished in the area of the intervertebral disk C2-C3 and chemonucleolysis in the other cervical disks. Each group of four animals was submitted to euthanasia with an anesthetic overdose 24 hours, eight, 30, 60, 90 and 120 days after the enzyme injection and sagittal sections of the treated disks, associated to adjacent cartilaginous endplates and bony structures were obtained for

histological analysis. It was observed 24 hours after disk injection nuclear digestion, characterized by cavitations and decrease of safranin-O staining intensity, indicating loss of proteoglycans. At eight days, the nuclear content was still vacuolated but more fibrillar. At 30 days, it was noted lesions and hemorrhage in the cartilaginous endplates. An irregularly defined mass was observed in the nuclear space on days 60th and 90th, but it seemed fibrocartilaginous tissue on day 120th. It was also observed microfractures and bone necrosis on day 90th, which were healed by day 120th. Chemonucleolysis with chymopapain associated to the ventral slot in the cervical column of dogs determines lysis of intervertebral disks, cervical instability and lesions of cartilaginous and bone adjacent structures that tend to repair with fibrocartilaginous tissue along the time.

Keywords: chemonucleolysis, chymopapain, cervical column, dog.

INTRODUÇÃO

A quimionucleólise é técnica alternativa à cirurgia convencional para o tratamento de discopatias e determina a dissolução do núcleo pulposo de um disco intervertebral (Bradford et al., 1983). A quimiopapaína, principal enzima quimionucleolítica, cliva os proteoglicanos da matriz, que são responsáveis pela manutenção da pressão osmótica no interior do disco, resultando em perda do conteúdo de água e, conseqüentemente, em retração do núcleo pulposo com subsequente descompressão da medula e nervos espinhais (Kitchel e Brown, 1992).

Segundo Smith (1993), a quimiopapaína não tem efeito sobre o colágeno ou tecidos nervosos e, caso escape para o espaço epidural após a administração no disco intervertebral, não penetra a dura-máter, que é colagenosa, como também não afeta as raízes nervosas cobertas por prolongamentos dessa meninge. De acordo com Simmons et al. (1984), o anel fibroso não é afetado devido a sua composição basicamente colagenosa, contudo referem que altas doses podem acarretar lesões inesperadas.

Segundo Bradford et al. (1983), o achado histológico mais evidente após a quimionucleólise é a perda de proteoglicanos, evidenciada pela redução da intensidade da coloração pela safranina-O no núcleo pulposo e no anel fibroso. Em pacientes humanos, tem sido relatada também a perda da basofilia da matriz cartilaginosa, mas sem efeitos no

anel fibroso. De acordo com esses autores, anormalidades dos tecidos adjacentes (ossos e placas terminais cartilaginosa) não foram evidenciadas no exame histológico de cães submetidos à quimionucleólise. Contudo, Fry e Johnson (1991) relataram colapso do núcleo pulposo e numerosos defeitos na placa terminal cartilaginosa um mês após a realização da quimionucleólise em cães, sendo que dois anos após o procedimento os discos intervertebrais tratados apresentavam-se normais.

Patt et al. (1993) avaliaram histologicamente 88 discos intervertebrais tratados com quimiopapaína e compararam com o mesmo número de discos não tratados. Relataram eosinofilia (fibras colágenas eosinofílicas) em 91% das amostras dos discos tratados em contraste com basofilia em 61% das amostras controle. As alterações da estrutura bioquímica do tecido discal foram refletidas pelo padrão de coloração alterado. As fibras colágenas eosinofílicas, normalmente mascaradas, tornam-se visíveis devido à lise enzimática da matriz basofílica, contudo a coloração eosinofílica homogênea também pode ser explicada por alterações na estrutura bioquímica da matriz. A eosinofilia tissular depende primariamente do número de fibras colágenas visíveis e pode também ser observada em discos degenerados não submetidos a quimionucleólise. Portanto, não indicam a coloração por hematoxilina-eosina isoladamente para avaliar a atividade da quimiopapaína.

Os sinais histológicos da atividade da quimiopapaína são menos pronunciados com o passar do tempo, uma vez que sua ação é imediata e irreversível. Portanto, a existência de fragmentos discais sem ou com pouca atividade enzimática indica que a enzima não atingiu essa região do disco (Patt et al., 1993).

Atiola et al. (1988) realizaram quimionucleólises em cinco discos intervertebrais cervicais (C2-C3 a C6-C7) de 16 cães assintomáticos e observaram, 24 horas após o procedimento, dissolução do núcleo pulposo e do anel fibroso perinuclear, com presença de fissuras e cavitações.

De acordo com Kudo et al. (1993), a quimiopapaína inicialmente acarreta perda de proteoglicanos associada a uma condensação dos componentes nucleares, denominada efeito halo. Segundo esses autores, após três meses, o centro do núcleo pulposo é preenchido por tecido fibrocartilaginoso associado à matriz homogênea contendo

proteoglicanos. Quando utilizaram doses mais altas de quimiopapaína (50U), o núcleo pulposo foi totalmente substituído por tecido fibrocartilaginoso denso.

Bradford et al. (1983) observaram completa ausência da coloração por safranina-O duas semanas após quimionucleólise, indicando perda total de proteoglicanos no espaço nuclear. Em algumas amostras o espaço nuclear apresentou-se como uma cavitação sem a presença de tecido residual. Afirmaram que a safranina-O estava presente em pequenas áreas das placas terminais cartilaginosas e no anel fibroso. Após três e seis meses do procedimento, observaram retorno da intensa coloração de safranina-O no anel fibroso, placas terminais cartilaginosas e no núcleo pulposo formado, que apresentou-se discretamente mais fibrilar que o normal e com celularidade esparsa, sugerindo regeneração. Consideram a quimionucleólise uma alternativa à excisão cirúrgica de um disco intervertebral, a qual resulta em diminuição brutal da síntese de proteoglicanos, fibrose e estreitamento irreversível do espaço intervertebral.

Este trabalho tem por objetivos avaliar os aspectos histológicos da quimionucleólise com quimiopapaína associada à fenda ventral em discos intervertebrais cervicais de cães assintomáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 24 cães adultos, clinicamente saudáveis, sem raça definida, machos e fêmeas, pesando entre 10 e 20 kg, provenientes do canil experimental do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Todos os animais foram submetidos a exame radiográfico da coluna cervical, que constou de radiografias simples nas projeções lateral e ventrodorsal e de mielografia, com a finalidade de descartar presença de compressão medular prévia. Para a realização da mielografia, foi utilizado como agente contrastante iohexol¹ na dose de 0,3 mL/kg.

Os animais foram submetidos a jejum por 12 horas, anestesiados de forma rotineira e posicionados em decúbito dorsal sobre calha, com a região cervical média apoiada em almofada permitindo o alinhamento das vértebras cervicais. Os membros torácicos foram tracionados caudalmente e fixados. Foi utilizada fita adesiva para fixação da cabeça e tórax

¹ Omnipaque 300 mg I/ml – Nycomed Ireland Ltd.

dos animais à mesa, evitando-se movimentos laterais. Após preparo do campo cirúrgico, foi realizado o acesso aos discos intervertebrais cervicais, conforme estabelecido por Piermattei (1993). O processo ventral da vértebra C2 foi removido com pinça goiva e uma falha óssea com, no máximo, 50% da largura e 33% do comprimento das vértebras C2 e C3 foi realizada por meio de uma perfuratriz elétrica, na velocidade de 5000 rpm. A profundidade foi a espessura completa do corpo vertebral até possibilitar a visualização da medula espinhal no canal vertebral. Posteriormente, foram realizadas quimionucleólises nos demais discos intervertebrais cervicais (C3-C4 a C6-C7). Para isso, os músculos longos do pescoço foram afastados lateralmente, na região dos espaços intervertebrais, ou seja, imediatamente caudal aos processos ventrais de C3, C4, C5 e C6, determinando mínimas lesões ao restante da musculatura. Dessa forma, as bordas ventrais dos discos intervertebrais foram visualizadas permitindo a inserção adequada das agulhas. Foi administrado em cada disco intervertebral exposto 4,8 mg (5,3 U) de quimiopapaína² (1.1 U/mg) reconstituída em 0,1 mL de solução tampão, 0,10 molar de fosfato de sódio, pH 6,5, contendo 0,05 molar de EDTA e 0,01 molar de cisteína. Após a administração da enzima, a seringa foi mantida na posição de injeção por um minuto e o conteúdo de refluxo foi reinjetado. Ao final dos procedimentos, os músculos longos do pescoço e os esternohióideos foram aproximados com fio absorvível em pontos simples contínuos. O tecido subcutâneo e a pele foram suturados com fio inabsorvível, em pontos tipo simples contínuo e Wolff, respectivamente.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos de quatro animais, sendo que cada grupo correspondeu a um período de avaliação pós-operatória. Dessa forma, os animais foram avaliados durante 24 horas após a cirurgia (grupo 1), oito dias (grupo 2), 30 dias (grupo 3), 60 dias (grupo 4), 90 dias (grupo 5) e 120 dias (grupo 6).

Após a cirurgia, guardadas as peculiaridades de cada grupo com relação ao tempo de observação, os cães foram mantidos em canis individuais por 10 dias e ao final deste período foram transferidos para canis coletivos (quatro cães/canil). No pós-operatório, os animais foram medicados com enrofloxacina³ (10 mg/kg por via subcutânea), a cada 24 horas, durante cinco dias e cetoprofeno⁴ (1,1 mg/kg por via subcutânea), a cada 24 horas

² Chymopapain 250U - Sigma

³ Duotril 10% - Duprat

⁴ Profenid injetável - Aventis

durante três dias. Além disso, permaneceram com colar cervical confeccionado de espuma até a retirada dos pontos, que aconteceu no 10º dia do pós-operatório.

Nas datas pré-estabelecidas, referentes ao período de observação pós-operatório de cada grupo, os cães foram sacrificados por sobredose anestésica. A coluna cervical (C1 a C7) foi removida após a desarticulação atlanto-occipital e C7-T1. Após a remoção de toda a musculatura cervical, foram obtidas cinco secções transversais da coluna cervical de cada animal, envolvendo discos intervertebrais tratados, PTCs e porções cranial e caudal dos corpos vertebrais adjacentes.

As amostras foram fixadas por 48 horas em formalina 10% tamponada. Posteriormente, foram descalcificadas em ácido fórmico a 8% associado ao ácido clorídrico a 8%, durante 14 dias. A seguir foram desidratadas em álcool 70, 80 e 95% por uma hora em cada, e em álcool absoluto (dois banhos de uma hora). Depois, o material foi diafanizado em dois banhos com xilol puro durante 40 minutos. Os fragmentos receberam então dois banhos de parafina, de 40 minutos cada, em estufa a 60° C e foram incluídos em parafina a temperatura ambiente durante 24 horas. Cortes sagitais de cinco micrômetros de espessura foram obtidos em micrótomo e montados em lâmina de vidro. Os fragmentos obtidos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), para a análise da morfologia, e safranina-O (SO), para a avaliação do conteúdo de proteoglicanos discais, e analisados ao microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os discos intervertebrais tratados com a quimiopapaína demonstraram, microscopicamente, sinais de digestão tecidual, como já descrito por Roggendorf et al. (1984), confirmando a atividade da enzima.

Nos cortes corados pela H&E foi observado, 24 horas após a administração da quimiopapaína, digestão do NP caracterizada por cavitações (matriz esponjiforme) (Fig.1A, 1B e 1C). Roggendorf et al. (1984) já haviam relatado frouxidão das fibras colágenas do núcleo e áreas microcísticas 24 horas após a realização da quimionucleólise. Semelhantemente, Atiola et al. (1988) observaram a dissolução do núcleo pulposo e de áreas perinucleares do anel fibroso, com fissuras e cavitações, a partir do primeiro dia após

o tratamento enzimático de discos intervertebrais cervicais caninos. Esses achados corroboram os dados de Patt et al. (1993), que afirmaram que a ligação da enzima ao substrato é imediata, assim como seus efeitos.

Ocorreram hiperemia e hemorragia nas regiões ósseas adjacentes aos discos tratados. Grande quantidade de células inflamatórias, principalmente mononucleares, estavam presentes no interior dos vasos sanguíneos. Como verificado por Roggendorf et al. (1984), ocorreu importante redução do volume tecidual do núcleo pulposo e, conseqüentemente, redução da espessura do espaço intervertebral, que foram observadas histologicamente. Como já descrito por Nitobe et al. (1988), isso é a manifestação física da perda de água e proteoglicanos do núcleo, resultante da ação enzimática.

Após oito dias da aplicação da enzima, o núcleo pulposo estava ainda vacuolizado, contudo mais fibrilar (Fig. 2A). Isso também foi observado nos cortes histológicos das porções mais internas do anel fibroso. Além disso, algumas lâminas do anel deixaram de ser concêntricas, como resultado da perda de volume nuclear e redução da espessura do espaço intervertebral.

Após 30 dias da aplicação da enzima, ocorreu grande redução da espessura do EIV, o que comprometeu a junção entre PTCs e anel fibroso, provavelmente em conseqüência da alteração anatômica dessas estruturas. As PTCs apresentavam lesões e áreas de hemorragia (Fig. 2C). Segundo Chen et al. (2003), a quimionucleólise com quimiopapaína pode ser responsável por essas lesões, contudo não discorrem sobre o mecanismo. Uma vez que a enzima tem ação imediata sobre os proteoglicanos do disco intervertebral, sugere-se que as alterações observadas sejam conseqüência da instabilidade vertebral causada pelo tratamento, determinando atrito entre PTCs adjacentes, anteriormente impossibilitado pela presença do núcleo pulposo. Fry e Johnson (1991) já haviam relatado colapso do núcleo pulposo e numerosos defeitos nas PTCs um mês após a realização da quimionucleólise em cães.

Ainda, 30 dias após a quimionucleólise, notou-se a presença de linha de cimentação evidente, núcleo cartilaginoso de calcificação, semelhante à “coração condróide”, e hipervascularização nas áreas lesadas das PTCs. Segundo Roggendorf et al. (1984) pode ocorrer hipervascularização como reação local à enzima. Os achados histológicos observados aos 60 dias foram semelhantes, embora a redução da espessura do espaço

intervertebral não fosse mais tão evidente, devido à presença de material amorfo no espaço nuclear. O anel fibroso apresentou-se mais delgado, mantendo apenas as lâminas mais externas.

Aos 90 dias ocorreu perda da arquitetura normal das estruturas ósseas adjacentes aos discos tratados. Foram verificadas microfraturas, osteonecrose e preenchimento com tecido cartilaginoso (Fig. 3B). As PTCs adjacentes aos discos tratados estavam ausentes e o espaço nuclear apresentou-se parcialmente preenchido por matriz fibrosa amorfa (Fig. 3C). Não há relatos na literatura de lesões ósseas após a quimionucleólise. Bradford et al (1983) utilizaram o mesmo protocolo de quimionucleólise cervical (dose e diluente) e relataram regeneração do núcleo pulposo, sem alteração de estruturas adjacentes. No presente trabalho, pode-se inferir que a realização da fenda ventral pode ter ampliado a instabilidade local com conseqüente atrito excessivo, resultando nessas lesões.

Aos 120 dias, observou-se intensa vascularização na região do disco intervertebral, inclusive com presença de grandes túneis vasculares. As estruturas ósseas foram remodeladas de forma irregular. O material presente no espaço nuclear tem aparência de tecido fibrocartilaginoso, mais fibroso do que cartilaginoso, semelhante a tecido cicatricial (Fig. 4A). Esses achados são semelhantes aos descritos por Kudo et al. (1993), embora tenham utilizado dose de quimiopapaína 10 vezes maior do que a deste estudo. Sabe-se que as ações da quimiopapaína são dose dependente (Lü et al. 1997). Portanto, a ocorrência de resultados semelhantes utilizando dose muito menor reforça a hipótese de instabilidade extra, resultante da fenda ventral.

As alterações da estrutura bioquímica do tecido discal, especialmente dos proteoglicanos, foram refletidas por um padrão de coloração pela SO alterado. Verificou-se intensa redução da intensidade de coloração do núcleo pulposo e das lâminas mais internas do anel fibroso 24 horas e oito dias após o procedimento (Fig. 1D). Ainda aos oito dias, foi observada no núcleo a união de células degeneradas, formando linhas, que sugerem tentativa de sustentação (Fig 2B). Segundo Bradford et al. (1983), o achado histológico mais evidente após a quimionucleólise é a perda de proteoglicanos, evidenciada pela redução da intensidade da coloração pela SO no núcleo pulposo e no anel fibroso.

Aos 30 dias após a aplicação da enzima, ocorreu redução da intensidade de coloração nas PTCs adjacentes aos discos tratados. Contudo, observou-se aumento da

intensidade de coloração do material nuclear, o que não se repetiu aos 60 e 90 dias (Fig. 2D e 3A). Nessas datas o espaço nuclear estava preenchido por material amorfo, fibroso e acelular, sem afinidade tintorial alguma (Fig. 3D).

Aos 120 dias, novamente observou-se aumento da intensidade da coloração pela SO no núcleo, indicando a presença de proteoglicanos. O material presente no espaço nuclear ainda era amorfo, contudo continha células semelhantes a condrócitos, sugerindo fibrocartilagem (Fig. 4B). Ao contrário do citado por Bradford et al. (1983), não ocorreu regeneração do núcleo pulposo, mas sim substituição.

CONCLUSÕES

A quimionucleólise dos discos intervertebrais C3-C4 a C6-C7 concomitante à fenda ventral de C2-C3 determina a lise de proteoglicanos e conseqüente perda de água, que se traduzem pela imediata redução da intensidade de coloração pela safranina -O e do volume nuclear. Morfologicamente, o tratamento determina vacuolização do núcleo pulposo, lesão nas placas terminais cartilaginosas e estruturas ósseas adjacentes aos discos tratados, que são substituídos por tecido fibrocartilaginoso ao longo do tempo.

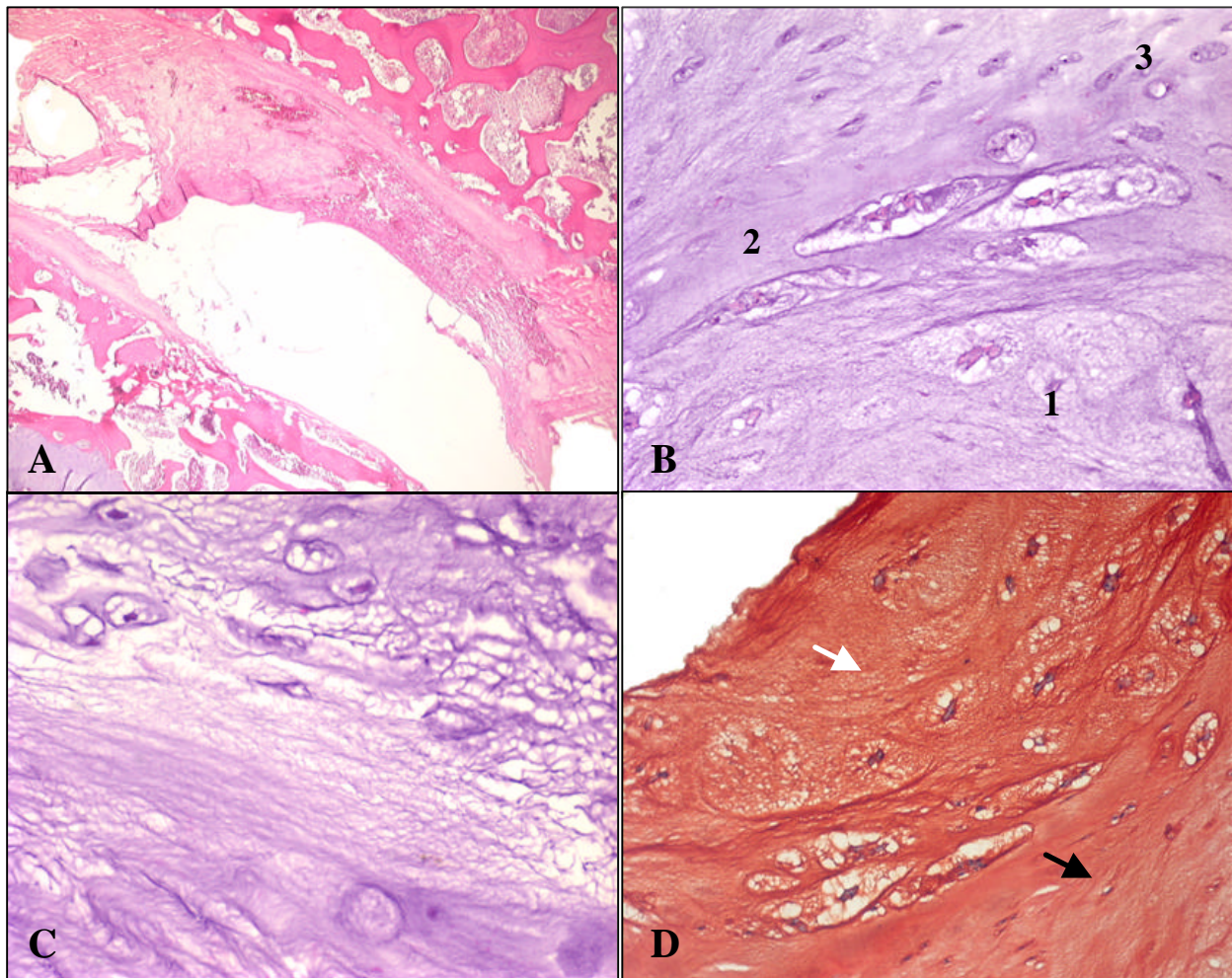


Figura 1. A: Aspecto microscópico de disco intervertebral 24 horas após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando digestão do núcleo pulposo com retração e perda de conteúdo (100X/H&E). B: Aspecto microscópico da junção entre núcleo pulposo (1), anel fibroso (2) e placa terminal cartilaginosa (3) 24 horas após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando presença de cavitações e frouxidão de fibras colágenas, sem alterações na placa terminal (200X /H&E). C: Aspecto microscópico do núcleo pulposo 24 horas após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando matriz espongiforme (400X/H&E). D: Aspecto microscópico do núcleo pulposo 24 horas após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando redução da intensidade de coloração do núcleo (seta branca) e das lâminas internas do anel fibroso (seta preta) pela SO (200X/SO).

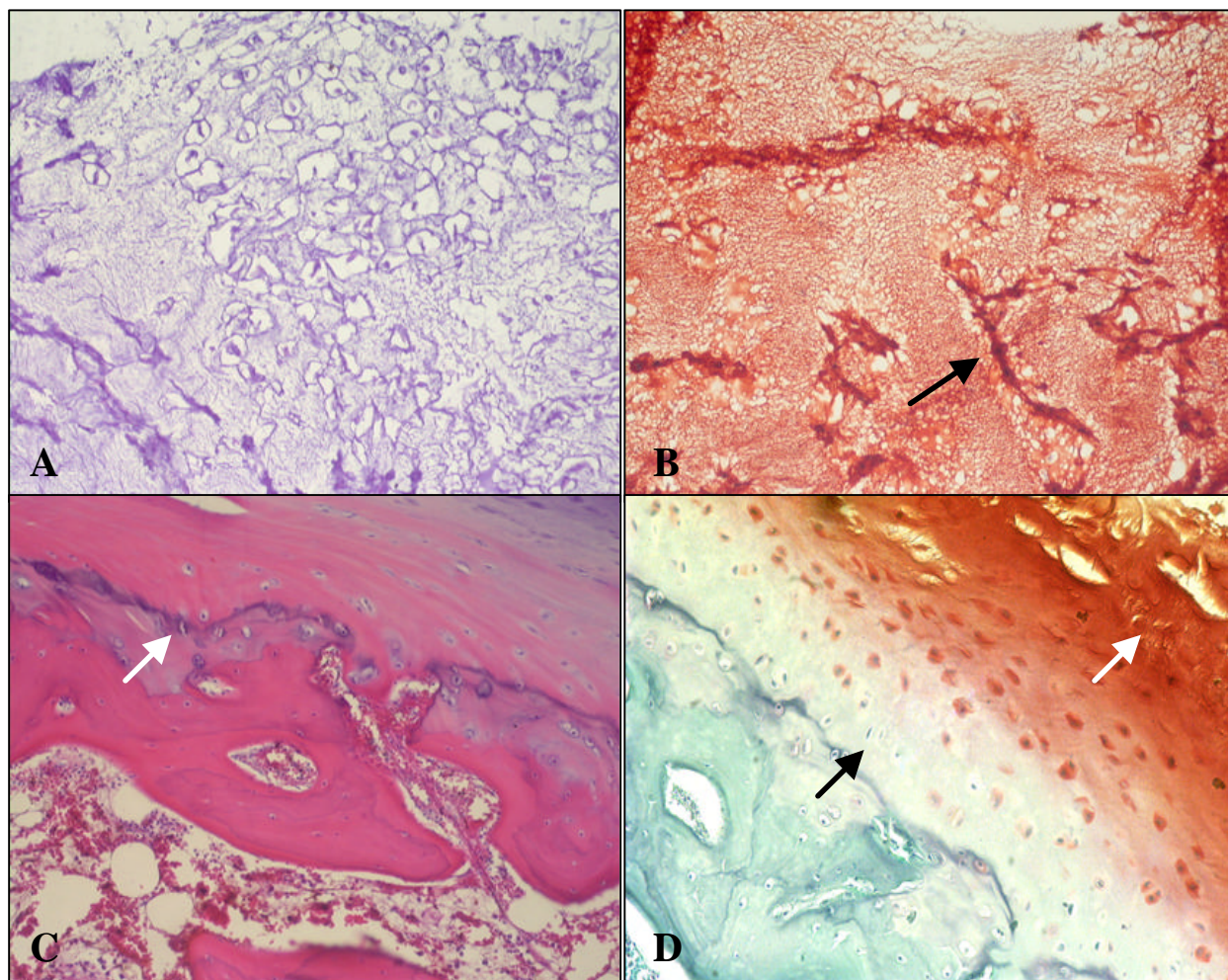


Figura 2. A: Aspecto microscópico do núcleo pulposo oito dias após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando o núcleo pulposo vacuolizado e mais fibrilar (400X/H&E). B: Aspecto microscópico do núcleo pulposo oito dias após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando redução da intensidade de coloração do núcleo pela SO e união de células degeneradas formando linhas (seta) (200X/SO). C: Aspecto microscópico do núcleo pulposo 30 dias após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando lesão na placa terminal cartilaginosa, hemorragia e presença de linha de cimentação (seta) (200X/H&E). D: Aspecto microscópico do núcleo pulposo 30 dias após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando redução da intensidade de coloração da placa terminal cartilaginosa pela SO (seta preta) e aumento da mesma no núcleo pulposo (seta branca) (200X/SO).

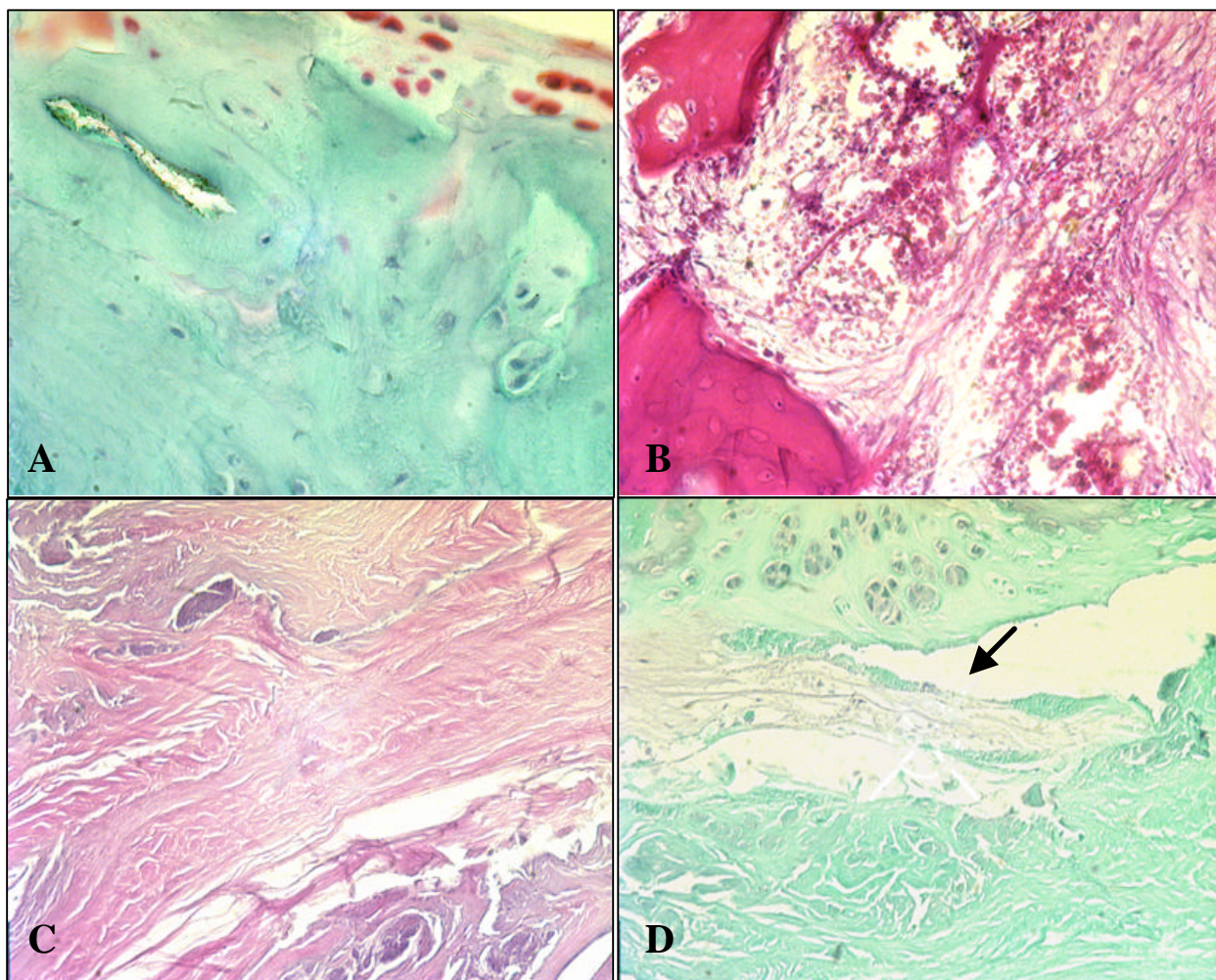


Figura 3. A: Aspecto microscópico da placa terminal cartilaginosa 60 dias após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando a placa terminal cartilaginosa estruturalmente alterada e com pouca afinidade pela SO (400X/SO). B: Aspecto microscópico de porção do corpo vertebral adjacente a um disco tratado com quimiopapaína 90 dias após o procedimento mostrando perda da arquitetura normal das estruturas ósseas, hemorragia e osteonecrose (200X/HE). C: Aspecto microscópico do material preenchendo o espaço nuclear 90 dias após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando matriz fibrosa amorfa (400X/H&E). D: Aspecto microscópico do material preenchendo o núcleo 90 dias após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando presença de material amorfo, fibroso e acelular, sem afinidade tintorial pela SO (seta) (200X/SO).

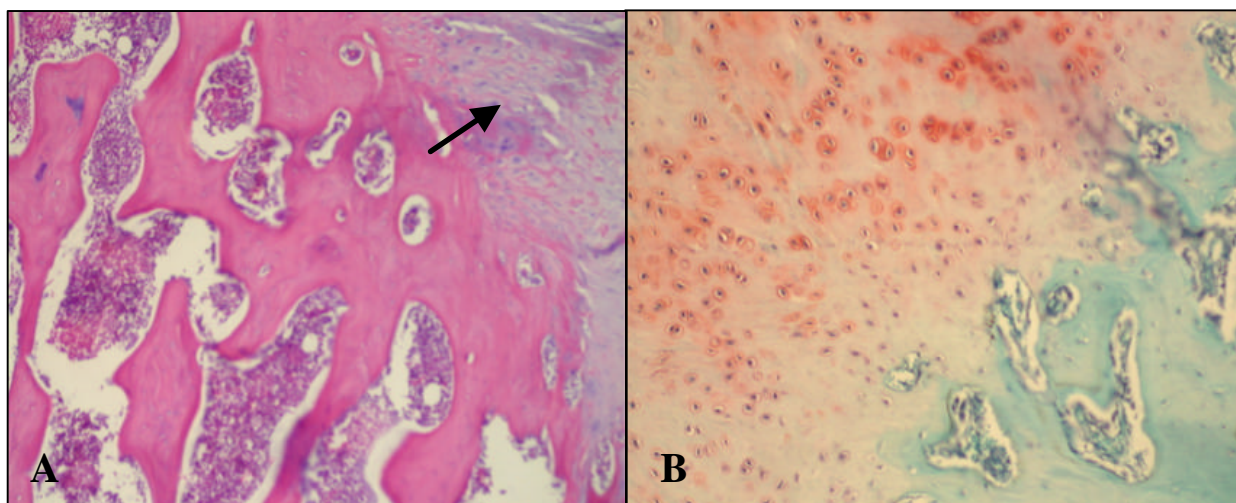


Figura 4. A: Aspecto microscópico da região do disco intervertebral 120 dias após a quimionucleólise com quimiopapaína mostrando estruturas ósseas remodeladas de forma irregular, ausência de placa terminal cartilaginosa e espaço nuclear preenchido por material fibrocartilaginoso (seta) (200X/H&E). B: Aspecto microscópico da região do disco intervertebral 120 dias após a quimionucleólise com quimiopapaína, mostrando aumento da intensidade da coloração do espaço nuclear pela SO e presença de material nuclear amorfo, com células semelhantes a condrócitos, sugerindo origem fibrocartilaginosa (200X/SO).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATIOLA, M.A.; BAILEY, C.S.; MORGAN, J.P. Cervical chemonucleolysis in the dog. A surgical technique. **Veterinary Surgery**, v.17, n.3, p.135-140, 1988.

BRADFORD, D.S.; COOPER, K.M.; OEGEMA, T.R. Chymopapain, chemonucleolysis and nucleus pulposus regeneration. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.65-A, n.9, p.1220-1231, 1983.

CHEN, T.; CRAWFORD, N.R.; SONNTAG, V.K.H. et al. Biomechanical effects of progressive anterior cervical decompression. **Spine**, v.26, n.1, p.6-14, 2001.

FRY, T.R.; JOHNSON, A.L. Chemonucleolysis for treatment of intervertebral disk disease. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.199, n.5, p.622-627, 1991.

KITCHEL, S.H.; BROWN, M.D. Complications of chemonucleolysis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.284, p.63-74, 1992.

KUDO, T.; SUMI, A.; HASHIMOTO, A. Experimental chemonucleolysis with chymopapain in canine intervertebral disks. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.55, n.2, p.211-215, 1993.

LÜ, D.S.; SHONO, Y.; ODA, I. et al. Effects of chondroitinase ABC and chymopapain on spinal motion segment biomechanics. Av in vivo biomechanical, radiologic, and histologic canine study. **Spine**, v.22, n.16, p.1828-1834, 1997.

NITOBÉ, T.; HARATA, S.; OKAMOTO, Y.; NAKAMURA, T.; ENDO, M. Degradation and biosynthesis of proteoglycans in the nucleus pulposus of canine intervertebral disc after chymopapain treatment. **Spine**, v.13, n.11, p.1332-1339, 1988.

PATT, S.; BROCK, M.; MAYER, H.M.; SCHREINER, C.; PEDRETTI, L. Nucleus Pulposus Regeneration after chemonucleolysis with chymopapain? **Spine**, v.18, n.2, p.227-231, 1993.

PIERMATTEI, D.L. The vertebral column. In: PIERMATTEI, D.L. **An atlas of surgical approaches to the bones and joints of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1993. p.54-59.

ROGGENDORF, W. BROCK, M.; GÖRGE, H. et al. Morphological alterations of degenerated lumbar disc following chemonucleolysis with chymopapain. **Journal of Neurosurgery**, v.60, p.518-522, 1984.

SIMMONS, J.W.; STAVINOHA, W.B.; KNODEL, L.C. Update and review of chemonucleolysis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.183, p.51-60, 1984.

SMITH, L. Chemonucleolysis – Personal history, trials and tribulations. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.287, p.117-124, 1993.