ADRIANO BARILE DORA

Utilização de células-tronco mesenquimais de medula óssea canina associadas ao uso de implantes metálicos no reparo de fraturas distais de rádio e ulna em cães de raças toy: estudo complementar com coelhos da Nova Zelândia

**São Paulo
2014**

ADRIANO BARILE DORA

Utilização de células-tronco mesenquimais de medula óssea canina associadas ao uso de implantes metálicos no reparo de fraturas distais de rádio e ulna em cães de raças toy: estudo complementar com coelhos da Nova Zelândia

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador (a):

Dra. Paula Fratini

De acordo: _____

Orientador

**São Paulo
2014**

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3018
FMVZ

Dora, Adriano Barile

Utilização de células-tronco mesenquimais de medula óssea canina associadas ao uso de implantes metálicos no reparo de fraturas distais de rádio e ulna em cães de raças toy: estudo complementar com coelhos da Nova Zelândia / Adriano Barile Dora. -- 2014.
100 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Dr^a. Paula Fratini.

1. Célula tronco. 2. Não união. 3. Fraturas. 4. Cães. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Utilização de células tronco mesenquimais de medula óssea canina associadas ao uso de implantes metálicos no reparo de fraturas distais de radio e ulna em cães de raças toy/Estudo complementar com coelhos da Nova Zelândia", protocolado sob o nº 2578/2012, utilizando 12 (doze) coelhos e 20 (vinte) cães, sob a responsabilidade Dra. Paula Fratini, foi aprovado em reunião de 12/3/2014 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Use of mesenchymal stem cells from canine bone marrow associated with the use of metallic implants in the repair of fractures of the distal radius and ulna in toy breeds of dogs/Complementary study with rabbits of New Zealand", protocol number 2578/2012, utilizing 12 (twelve) rabbits and 20 (twenty) dogs, under the responsibility Dra. Paula Fratini, was approved in the meeting of day 3/12/2014 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 13 de março de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuvet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DORA, Adriano Barile

Título: Utilização de células-tronco mesenquimais de medula óssea canina associadas ao uso de implantes metálicos no reparo de fraturas distais de rádio e ulna em cães de raças toy/ Estudo complementar com coelhos da Nova Zelândia.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades;

Aos meus pais Orley Dora e Maria Cristina Ruffo Barile, pelo constante encorajamento durante toda a vida, e pela admiração que sempre demonstram por mim;

À minha esposa Ana Paula Olivier Dora, pelo companheirismo e auxílio, e à minha filha Júlia Olivier Dora, pelo amor e carinho;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Paula Fratini, por ter acreditado na minha capacidade, e me ensinado muito durante todo o processo;

À Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino, pelo acolhimento e imensa ajuda, bem como a todo o Departamento de Anatomia, a que tanto admiro;

À Prof^a. Dr^a. Ana Carolina e equipe do setor de radiologia da USP, que me ajudou a aprimorar o trabalho e torna-lo mais fidedigno;

À toda a equipe do Hospital Veterinário Arca de Noé 24h, pelo enorme suporte técnico que conferiram ao trabalho, e também pela disposição em contribuir de diversas maneiras para possibilitar a conclusão do trabalho: Cínthia Toito, Marcela Lorenzo, Fernanda França, Andrea Armidoro, Jessica Nishihara Lauriano, Mariana Myiata, Thais Palma, Raquel Cseh, Célio Jardim dos Santos Jr., Talita Tomadon da Silva Lima, Lygia Keiko, Camila Matias Zacarias, Caroline Mendonça, Rafael Borges dos Santos, Antonio Rodrigues Fernandes Jr., Bela Santana, Elaine Ribeiro do Nascimento, Magna Cleide, Pedro Correia, Jane Almeida.

Em especial ao médico veterinário Felipe Rodrigues, por ter contribuído diretamente nas cirurgias dos pacientes, tanto no auxílio, como no tratamento pré e pós-operatório, e no acompanhamento dos casos. Muito obrigado!

À equipe de laudos radiográficos Telerradiologia Veterinária.

Aos funcionários da limpeza, que foram muito importantes na manutenção do bem-estar de todos os animais, e sempre muito solícitos;

À Cãomedica, pelo fornecimento dos implantes ortopédicos, em especial ao Juarez.

Ao anestesiista Mário Ferraro, que seguiu à risca todos os protocolos determinados desde o início, com muito carinho por todos os pacientes deste projeto;

À Cirleide Appolinario, funcionária do Hospital e profissional exemplar, que ajudou em muitas ocasiões na organização do projeto;

Ao Dr. Ms. Luiz Fernando Garrido, pela amizade verdadeira de tantos anos, e pelo apoio imenso na realização do projeto, nas correções e sugestões;

Ao Daniel Tonin Benedetti, pelo apoio em discutir tantas vezes o projeto, e contribuir bastante pelo conhecimento que adquiri;

À Elisa Rezende Vieira, que muito colaborou nas traduções;

Ao Diego Carvalho Viana, pela colaboração;

À Rose Eli Ricci, pelo grande auxílio no projeto;

Aos clientes que seguiram corretamente todas as etapas, e foram nossos parceiros;

Aos pacientes amados, que são a razão de tudo.

**Dedico este projeto à toda a minha família,
que está sempre em meu coração**

.

RESUMO

DORA, A. B. **Utilização de células-tronco mesenquimais de medula óssea canina associadas ao uso de implantes metálicos no reparo de fraturas distais de rádio e ulna em cães de raças toy**: estudo complementar com coelhos da Nova Zelândia. [Use of mesenchymal stem cells from canine bone marrow associated with the use of metallic implants in the repair of fractures of the distal radius and ulna in toy breeds of dogs/ Complementary study with rabbits of New Zealand]. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A terapia celular é uma ferramenta que tem se mostrado eficiente para o tratamento de várias patologias veterinárias em estudos experimentais e clínicos, incluindo a estimulação osteogênica para o tratamento de não união e reparo de fraturas distais de rádio e ulna em cães. Muitas são as vantagens da utilização de células-tronco, ela é um tipo diferenciado de célula com alta capacidade de proliferação, auto renovação, produção de diferentes linhagens celulares e regeneração de tecidos, estando presente em embriões, células de cordão umbilical e medula óssea. O objetivo deste trabalho foi a avaliação clínica e radiográfica de pacientes com fraturas distais de rádio e ulna após cirurgia e tratamento com células-tronco de medula óssea de fetos caninos diretamente no foco da fratura. As avaliações radiográficas mostraram cicatrização óssea a partir de 45 dias pós-cirurgia nos dois grupos estudados, somente com cirurgia convencional e implantes e também no grupo da cirurgia convencional com implantes associada à terapia com células-tronco de medula óssea. Mostrando assim, que a terapia celular pode ser uma ferramenta favorável para auxiliar na consolidação óssea de fraturas distais de rádio e ulna. Paralelamente, realizamos um estudo com coelhos da Nova Zelândia para avaliar radiograficamente e histologicamente o uso de um scaffold – esponja de colágeno com células tronco de medula óssea – em modelo de fratura similar ao encontrado em cães realizado neste presente estudo, e observamos que um scaffold com células no local da fratura pode auxiliar de forma significativa na consolidação óssea

Palavras-chave: Célula tronco. Não união. Fraturas. Cães.

ABSTRACT

DORA, A. B. Use of mesenchymal stem cells from canine bone marrow associated with the use of metallic implants in the repair of fractures of the distal radius and ulna in toy breeds of dogs: complementary study with rabbits of New Zealand. [Utilização de células-tronco mesenquimais de medula óssea canina associadas ao uso de implantes metálicos no reparo de fraturas distais de rádio e ulna em cães de raças toy/ estudo complementar com coelhos da Nova Zelândia]. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Cell therapy has been an effective tool for the treatment of several animal diseases in experimental and clinical studies, including osteogenic stimulation for the treatment of non-union and repair fractures of distal radius and ulna in dogs. There are many advantages of using stem cells since this differentiated cell type has high proliferation capacity, self renewal, production of different cell lines and tissue regeneration, being present in embryos, cells from umbilical cord and bone marrow. The aim of this study was to perform a clinical and radiographic evaluation of dogs with distal radius and ulna fractures after surgery and treatment with stem cells from canine fetuses' bone marrow directly into the fracture. Radiographic evaluations showed bone regeneration from 45 days post-surgery in both groups, only with conventional surgery and implant and also in the conventional surgery group with implants associated with stem cells from bone marrow therapy. Thus, cell therapy can be a favorable tool to assist in bone healing of distal fractures of radius and ulna. In parallel, we conducted a study with New Zealand rabbits for radiologically and histologically evaluate the use of a scaffold - collagen sponge with bone marrow stem cells - similar to that found in the fracture model in dogs performed in the present study, and we observed that an scaffold with cells on fracture site can help significantly in bone healing.

Keywords: Stem cell. Non union. Fractures. Dogs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Paciente anestesiado durante o exame de fluoroscopia	27
Figura 2 – Fotografias referentes à conduta operatória adotada.....	29
Figura 3 – Animal A1: durante primeiro atendimento	38
Figura 4 – Animal A1: radiografia pré-operatória.....	38
Figura 5 – Animal A1: Trans-operatório	40
Figura 6 – Animal A1: Trans-operatório – fluoroscopia	40
Figura 7 – Animal A1: Radiografia – Pós-operatório imediato.....	41
Figura 8 – Animal A1: Radiografia após cicatrização, 45 dias após a cirurgia .	42
Figura 9 – Animal A2: radiografia pré-operatória.....	44
Figura 10 – Animal A2:Trans-operatório	45
Figura 11 – Animal A2:Trans-operatório – fluoroscopia	45
Figura 12 – Animal A2: Radiografia – Pós-operatório imediato.....	46
Figura 13 – Animal A2: Radiografia após cicatrização, 45 dias após a cirurgia.....	47
Figura 14 – Animal A3: durante o primeiro atendimento, e radiografia pré- operatória	48
Figura 15 – Animal A3: Trans-operatório	50
Figura 16 – Animal A3: Trans Trans-operatório – fluoroscopia	50
Figura 17 – Animal A3: Radiografia – Pós-operatório imediato.....	51
Figura 18 – Animal A3: Radiografia após cicatrização, 90 dias após a cirurgia.....	52
Figura 19 – Animal A4: durante o primeiro atendimento	54
Figura 20 – Animal A4: radiografia pré-operatória.....	54
Figura 21 – Animal A4: Trans-operatório	56
Figura 22 – Animal A4: Trans-operatório – fluoroscopia	56
Figura 23 – Animal A4: Radiografia – Pós-operatório imediato.....	57

Figura 24 – Animal A4: Radiografia após cicatrização, 90 dias após a cirurgia.....	58
Figura 25 – Animal A5: durante o primeiro atendimento	60
Figura 26 – Animal A5: radiografia pré-operatória.....	60
Figura 27 – Animal A5: Trans-operatório	62
Figura 28 – Animal A5: Trans-operatório – fluoroscopia	62
Figura 29 – Animal A5: Radiografia – Pós-operatório imediato.....	63
Figura 30 – Animal A5: Radiografia após cicatrização, 75 dias após a cirurgia.....	64
Figura 31 – Animal B1: durante o primeiro atendimento	65
Figura 32 – Animal B1: radiografia pré-operatória de ambos os membros	66
Figura 33 – Animal B1: Trans-operatório	67
Figura 34 – Animal B1: Trans-operatório – fluoroscopia	67
Figura 35 – Animal B1: Radiografia – Pós-operatório imediato.....	68
Figura 36 – Animal B1: Radiografia após cicatrização, 45 dias após a cirurgia	70
Figura 37 – Animal B2: durante o primeiro atendimento	71
Figura 38 – Animal B2: radiografia pré-operatória.....	71
Figura 39 – Animal B2: Trans-operatório	73
Figura 40 – Animal B2: Trans-operatório – fluoroscopia	73
Figura 41 – Animal B2: Radiografia – Pós-operatório imediato.....	74
Figura 42 – Animal B2: Radiografia após cicatrização, 45 dias após a cirurgia.....	75
Figura 43 – Animal B3: durante o primeiro atendimento	76
Figura 44 – Animal B3: radiografia pré-operatória.....	77
Figura 45 – Animal B3: Trans-operatório	78
Figura 46 – Animal B3: Trans-operatório – fluoroscopia	78
Figura 47 – Animal B3: Radiografia após cicatrização, 90 dias após a cirurgia.....	78

Figura 48 – Animal B4: radiografia pré-operatória.....	80
Figura 49 – Animal B4: Trans-operatório	81
Figura 50 – Animal B4: Trans-operatório – fluoroscopia	82
Figura 51 – Animal B4: Radiografia – Pós-operatório imediato.....	82
Figura 52 – Animal B4: Aplicação de células-tronco 15 dias após cirurgia	83
Figura 53 – Animal B4: Radiografia após cicatrização, 75 dias após a cirurgia.....	85
Figura 54 – Animal B5: pré-operatório	86
Figura 55 – Animal B5: Radiografia pré-operatória	86
Figura 56 – Animal B5: Trans-operatório	88
Figura 57 – Animal B5: Aplicação de células-tronco com auxílio de fluoroscopia.....	88
Figura 58 – Animal B5: Após recuperação do quadro. Responsável abandonou o tratamento antes de finalizar o protocolo.....	90
Figura 59 – Período trans-operatório	92
Figura 60 – Fluoroscopia no período pós-operatório imediato	92
Figura 61 – Pós-operatório: 30 dias após a cirurgia.....	93
Figura 62 – Radiografia 60 dias após cirurgia.....	94
Figura 63 – Período trans-operatório	95
Figura 64 – Radiografia pós-operatória imediato	95
Figura 65 – Radiografia simples: 30 dias de pós-operatório	96
Figura 66 – 60 dias de pós-operatório.....	96
Figura 67 – Trans-operatório.....	97
Figura 68 – Pós-operatório imediato	98
Figura 69 – Radiografia 30 dias de pós-operatório	98
Figura 70 – 60 dias de pós-operatório.....	99
Figura 71 – Trans-operatório.....	99
Figura 72 – Pós-operatório imediato	100

Figura 73 – 30 dias de pós-operatório.....	100
Figura 74 – 60 dias de pós-operatório.....	101
Figura 75 – Análise comparativa dos resultados radiográficos encontrados nos diferentes grupos tratados.....	101
Figura 76 – Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo A com 30 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data	102
Figura 77 – Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo A com 60 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data	102
Figura 78 – Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo B com 30 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data	103
Figura 79 – Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo B com 60 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data	103
Figura 80 – Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo C com 30 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data	104
Figura 81 – Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo C com 60 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data	104
Figura 82 – Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo D com 30 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data	105
Figura 83 – Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo D com 60 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupo A – controle: Animais com fratura distal de rádio e ulna que passaram por cirurgia ortopédica.	37
Tabela 2 – Grupo B: Animais com fratura distal de rádio e ulna que passaram por cirurgia ortopédica, e aplicação de células-tronco	37
Tabela 3 – Hemograma do animal A1 – Período pré-operatório	39
Tabela 4 – Exames bioquímicos do animal A1 – Período pré-operatório.....	39
Tabela 5 – Animal A1: Hemograma - Período pós-operatório.....	41
Tabela 6 – Animal A1: Exames bioquímicos - Período pós-operatório	42
Tabela 7 – Animal A1: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom	43
Tabela 8 – Animal A2: Hemograma – Período pré-operatório	44
Tabela 9 – Animal A2: Exames bioquímicos – Período pré-operatório	45
Tabela 10 – Animal A2: Hemograma - Período pós-operatório.....	46
Tabela 11 – Animal A2: Exames bioquímicos - Período pós-operatório	47
Tabela 12 – Animal A2: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom	47
Tabela 13 – Animal A3: Hemograma – Período pré-operatório	49
Tabela 14 – Animal A3: Exames bioquímicos – Período pré-operatório	49
Tabela 15 – Animal A3: Hemograma - Período pós-operatório.....	51
Tabela 16 – Animal A3: Exames bioquímicos - Período pós-operatório	52
Tabela 17 – Animal A3: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom	53
Tabela 18 – Animal A4: Hemograma – Período pré-operatório	55
Tabela 19 – Animal A4: Exames bioquímicos – Período pré-operatório	55
Tabela 20 – Animal A4: Hemograma - Período pós-operatório.....	57
Tabela 21 – Animal A4: Exames bioquímicos - Período pós-operatório	58
Tabela 22 – Animal A4: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom	59
Tabela 23 – Animal A5: Hemograma – Período pré-operatório	61

Tabela 24 – Animal A5: Exames bioquímicos – Período pré-operatório	61
Tabela 25 – Animal A5: Hemograma - Período pós-operatório.....	63
Tabela 26 – Animal A5: Exames bioquímicos - Período pós-operatório	64
Tabela 27 –Animal A5: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório.....	65
Tabela 28 – Animal B1: Hemograma – Período pré-operatório	66
Tabela 29 – Animal B1: Exames bioquímicos – Período pré-operatório	67
Tabela 30 – Animal B1: Hemograma - Período pós-operatório.....	68
Tabela 31 – Animal B1: Exames bioquímicos - Período pós-operatório	69
Tabela 32 – Animal B1: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom.....	69
Tabela 33 – Animal B2: Hemograma – Período pré-operatório	72
Tabela 34 – Animal B2: Exames bioquímicos – Período pré-operatório	72
Tabela 35 – Animal B2: Hemograma - Período pós-operatório.....	74
Tabela 36 – Animal B2: Exames bioquímicos - Período pós-operatório	75
Tabela 37 – Animal B2: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom.....	76
Tabela 38 – Animal B3: Hemograma – Período pré-operatório	77
Tabela 39 – Animal B3: Exames bioquímicos – Período pré-operatório	78
Tabela 40 – Animal B3: Hemograma - Período pós-operatório.....	79
Tabela 41 – Animal B3: Exames bioquímicos - Período pós-operatório	79
Tabela 42 – Animal B3: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom.....	80
Tabela 43 – Animal B4: Hemograma – Período pré-operatório	81
Tabela 44 – Animal B4: Exames bioquímicos – Período pré-operatório	82
Tabela 45 – Animal B4: Hemograma - Período pós-operatório.....	84
Tabela 46 – Animal B4: Exames bioquímicos - Período pós-operatório	84
Tabela 47 – Animal B4: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom.....	85
Tabela 48 – Animal B5: Hemograma – Período pré-operatório	87

Tabela 49 – Animal B5: Exames bioquímicos – Período pré-operatório	87
Tabela 50 – Animal B5: Hemograma - Período pós-operatório.....	89
Tabela 51 – Animal B5: Exames bioquímicos - Período pós-operatório	89
Tabela 52 – Animal B5: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom.....	90
Tabela 53 – Comparação dos resultados entre os grupos A e B	91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 NÃO UNIÃO ÓSSEA	19
2.2 CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR	20
3 JUSTIFICATIVA.....	21
4 OBJETIVOS.....	22
4.1 OBJETIVO GERAL	22
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5 MATERIAS E MÉTODOS	23
5.1 COLETA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE FETOS CANINOS	23
5.2 CULTIVO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA.....	23
5.3 SELEÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS – CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DO ANIMAL NO ESTUDO	24
5.4 EXAMES COMPLEMENTARES	26
5.4.1 Técnica radiográfica simples	26
5.4.2 Exames laboratoriais	26
5.4.3 Arco cirúrgico (Fluoroscopia)	26
5.4.4 Intervenção Cirúrgica - Osteossíntese de rádio e ulna em cães com uso de placa bloqueada em T e aplicação de células-tronco....	27
5.5 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E CONTROLE DE DOR	29
5.6 MEDICAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA	29
5.7 ESTUDO COMPLEMENTAR COM COELHOS DA NOVA ZELÂNDIA	29
5.7.1 Utilização de esponja de colágeno como scaffold biológico	30
5.7.2 Tratamento <i>in vivo</i> das fraturas	30
5.7.3 Grupos animais	31
5.7.4 Procedimento cirúrgico	31
5.7.5 Procedimento anestésico	33
5.7.6 Conduta operatória	33
5.7.7 Técnica da placa bloqueada.....	34
5.7.8 Medicação pós-operatória	34
5.7.9 Preparação do material para o procedimento histológico	34
6 RESULTADOS.....	36
6.1 ANIMAIS – CÃES	36
6.1.1 Grupo controle	37
6.1.2 Grupo tratamento	65
6.2 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS TRATADOS	77
6.3 ANIMAIS - COELHOS	78
6.3.1 Grupo controle	78
6.3.2 Grupo tratamento	80
6.3.3 Histologia dos coelhos	88
6.3.4 Análise comparativa entre os grupos tratados	91
7 DISCUSSÃO	93
8 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96
ANEXO	102

1 INTRODUÇÃO

As fraturas do rádio e da ulna representam de 8,5% a 18% da casuística de fraturas nos cães e gatos, com a maioria dos autores relacionando incidência média de 17% constituindo-se o terceiro tipo mais frequente em cães (DENNY, 1990; RUDD; WHITEHAIR, 1992; EGGER, 1993; MUIR, 1997). Dentre as causas mais comuns destacam-se acidentes automobilísticos e pequenos traumas como saltos ou quedas, principalmente nas raças caninas *toy* (PROBST, 1990; MUIR, 1997). O prognóstico para cicatrização das fraturas distais do rádio depende em parte do porte do paciente. Em cães jovens de médio e grande porte, geralmente evoluem para a cicatrização, independentemente do método de estabilização, enquanto que nas raças de pequeno porte, existe um alto risco para o desenvolvimento de união retardada e não-união, além de deformidades do crescimento, rigidez articular e hiperextensão do carpo, refletindo com isso a complexidade no tratamento destas fraturas (WELCH, 1997).

As não-uniões são complicações comuns em fraturas localizadas em ossos cujo recobrimento de tecido muscular é escasso, com canal medular de diâmetro reduzido, ou pouca vascularização. Nesses ossos, outras complicações também acontecem com maior frequência e, tanto as reduções cirúrgicas, quanto os tratamentos conservadores representam maior dificuldade para alguns autores. Em raças pequenas, a taxa de complicação é ainda maior, devido à vascularização ineficiente, chegando a 60% de casos com não-união em alguns trabalhos. As fraturas de rádio e ulna são exemplos significativos desse tipo de complicação nessas raças. Sendo assim, outras alternativas estão sendo estudadas para aprimorar a abordagem nesses casos, como proteínas que estimulem a quimiotaxia de células mesenquimais indiferenciadas. Desta maneira, essas células se diferenciam em osteoblastos, e formam o calo ósseo (FERRIGNO et al., 2008).

A formação e o reparo ósseo dependem da presença de células tronco mesenquimais pluripotentes capazes de se diferenciar em osteoblastos, fatores de crescimento e diferenciação que dirijam estas células ao foco da lesão, uma matriz para migração e fixação destas células e fatores angiogênicos que permitam a formação de uma rede vascular para o osso neoformado. Células

pluripotentes com potencial osteoblástico tem sido isoladas de várias espécies, inclusive a canina (BRUDER et al., 1998).

Em humanos, o processo de cicatrização da fratura é alterado em cerca de 10% a 20% das fraturas, resultando em não união e podendo causar graves deficiências. Estas fraturas são tratadas principalmente com auto-enxertos ósseos, que podem estar associados com morbidades relacionadas ao procedimento de colheita, têm uma oferta limitada e potencial reparador imprevisível (GRANERO-MOLTÓ et al., 2009).

O reparo de fraturas depende de uma sequência de condrogênese, osteogênese e remodelamento, que em última instância, restaura a integridade do osso e suas características biomecânicas (CHEN et al., 2003).

Apesar do desenvolvimento de novas tecnologias e avanços na ortopedia clínica com relação às fraturas, ainda existe um subconjunto de fraturas que continuam a ser deficientes na reparação óssea, culminando com a não união óssea. Atualmente, as novas estratégias para o tratamento destas fraturas incluem a aplicação de células tronco, devido ao seu potencial regenerativo (TSENG; LEE; REDDI, 2008).

As células tronco mesenquimais são capazes de se diferenciar em várias linhagens celulares, como condrócitos, osteócitos, adipócitos, monócitos e astrócitos (DJOUAD et al., 2013). A terapia celular, atualmente, têm sido uma ferramenta útil na medicina regenerativa com alto potencial terapêutico devido à capacidade de auto renovação e diferenciação destas células (WANG et al., 2009). Nos últimos anos a ortopedia vem procurando novos métodos para um tratamento que obtenha como efeito uma reparação óssea mais efetiva. Por isso, muitos estudos envolvendo artifícios biológicos e moleculares com objetivo de melhorar a cicatrização óssea estão sendo realizados (BARROS et al., 2006).

As fraturas com não união óssea continuam a ser um desafio e um grande problema na cirurgia ortopédica, por isso, este projeto tem como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com células tronco mesenquimais de medula óssea canina no tratamento clínico de fraturas de difícil calcificação em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NÃO UNIÃO ÓSSEA

A não-união de fraturas é um processo em que há uma interrupção do reparo biológico em um foco de fratura, por motivo ainda não esclarecido, levando à falta de consolidação do tecido ósseo. Em casos assim, normalmente é necessária uma intervenção para que ocorra a consolidação óssea, e a maioria requer tratamento cirúrgico. O diagnóstico é feito quando não há sinais radiológicos de consolidação óssea, até 3 meses após a fratura (LA VELLE, 1998).

De acordo com Ferrigno et al. (2008), as raças miniaturas são as mais acometidas por fraturas diafisárias, com lesões principalmente no terço distal (64,93%), e também apresentam o maior número de não união óssea (31,7%). Algumas causas apontadas pelo autor para a não união referem-se à dificuldade de imobilização, pouca cobertura de tecidos moles sobre o osso, canal medular estreito, pouca vascularização e demora na cicatrização. Schmaedecke et al. (2003) cita, ainda, como causas de não união, intervalo muito grande entre as margens do foco de fratura, perda de suprimento sanguíneo, infecção, hiperemia, compressão, quantidade excessiva de implantes, cominuição severa, implantes feitos de material inadequado, manejo pós-operatório impróprio, e fatores metabólicos.

No caso das osteomielites e/ou infecção de tecidos moles, geralmente as fraturas são graves; o tratamento convencional recomendado é o uso de antibióticos de amplo espectro, e frequentemente é necessário remover cirurgicamente o tecido necrótico e/ou fragmento ósseo severamente danificado; a vascularização óssea, então, fica atenuada e a consolidação óssea pode não acontecer (YANESELLI, 2013). Cães com não união, não raro, requerem futuras intervenções cirúrgicas e, ocasionalmente, amputação do membro pode ser necessária (HUNT et al., 1980; MUIR, 1997).

A consolidação óssea pode ocorrer espontaneamente, caso a extremidade dos fragmentos ósseos não estejam intimamente ligados; entretanto, neste caso, há a formação de um calo fibrocartilaginoso, que sofre ossificação e reorganização ao longo dos anos, havendo a cura espontânea. Para isso é necessário um bom aporte sanguíneo e tecido adjacente aos fragmentos que esteja saudável. Nos casos de

não união, o calo fibrocartilaginoso não se forma e, aos poucos, a extremidade dos ossos vai sendo reabsorvido e desaparece (FOSSUM, 2007).

2.2 CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR

As células-tronco ideais para a realização de transplantes devem ser provenientes de fontes de fácil acesso, preferencialmente possuir rápida expansibilidade em cultivo, devem ser imunologicamente inertes, apresentar capacidade de sobrevivência e integração no sítio hospedeiro e ter capacidade de se diferenciar em outros tipos de células especializadas (AZIZI et al., 1998). As células-tronco podem ser classificadas como embrionárias, fetais e adultas, dependendo de seu período de isolamento.

Dentre as fontes de células-tronco, destacam-se as de origem fetal, como fontes celulares promissoras, uma vez que podem ser isoladas tanto do feto quanto das suas estruturas extra fetais como o cordão umbilical, medula óssea, membrana amniótica, líquido amniótico, placenta, entre outras (BOSSOLASCO et al., 2006). Estas são fontes celulares muito promissoras, uma vez que já foi observado que estas células-tronco mesenquimais isoladas de tecidos fetais são menos imunogênicas, não expressando o antígeno tipo II de superfície leucócito humano (HLA) (MIAO et al., 2005). As células-tronco mesenquimais possuem uma alta capacidade de expansão mitótica in vitro, sendo estas responsáveis pela manutenção e renovação de tecidos adultos, podendo também se diferenciar em diversas linhagens celulares de origem mesodérmica como osteócitos, condrócitos e adipócitos. Este tipo celular vem sendo bastante explorado nos últimos anos, devido ao seu potencial para a regeneração de órgãos e tecidos e terapias celulares, clinicamente estas células estão sendo exploradas em várias condições, incluindo lesões ortopédicas, doenças auto imunes e doenças hepáticas (Kim, 2013).

Existe atualmente um grande entusiasmo quanto às várias possibilidades de se empregar as células-tronco para o tratamento de doenças em diversas espécies animais, principalmente voltado para os animais domésticos, como o cão (Zamprogno, 2007; Oliveira, 2010).

Para que estes trabalhos sejam cada vez mais aplicados na medicina veterinária, estudos avaliando a eficácia dessas terapias são de extrema importância.

3 JUSTIFICATIVA

A grande casuística de animais com fraturas ósseas e casos de não união, principalmente em cães de raça toy, fornece modelos bastante enriquecedores para estudos de terapia celular visando avanços na área da medicina veterinária regenerativa. Tendo em vista o número de tratamentos cirúrgicos convencionais não eficientes para esses tipos de traumas, é de grande importância buscar terapêuticas eficientes para auxiliar este problema e contribuir para o avanço da ortopedia veterinária.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento com células tronco mesenquimais de medula óssea canina no tratamento clínico-cirúrgico de fraturas em cães.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Manutenção e expansão das culturas de células-tronco de medula óssea canina;
- Estabelecer condições ideais de tratamento com células tronco de medula óssea canina;
- Avaliar mediante teste de marcha a evolução dos animais transplantados;
- Avaliar o potencial terapêutico do uso de células-tronco mesenquimais de medula óssea canina, nos pacientes portadores de fratura de rádio e ulna distal;
- Avaliar através de radiografias a evolução da consolidação óssea, dos animais portadores de fratura de rádio e ulna distal, tratados com células-tronco mesenquimais de medula óssea canina.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 COLETA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE FETOS CANINOS

As células de medula óssea caninas foram coletadas do útero de fêmeas grávidas, oriundas das campanhas de castração, efetuadas no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Cidade de São Paulo. Após sedação das fêmeas com 0,1 mg/kg de acepromazina (Acepran, Univet, São Paulo), 0,5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí) e 20 mg/kg de quetamina (dopalen, Vetbrands, Jacareí), foi feita a cirurgia de ovário-salpingo-histerectomia, e o útero foi coletado. O material coletado foi armazenado em gelo e transportado para a FMVZ-USP para ser processado. Os úteros foram seccionados para remoção dos fetos. Para a coleta de medula óssea, foi feita a dissecação do membro pélvico e torácico. Após a remoção do fêmur, tíbia, rádio e ulna, foram removidas as epífises proximais e distais e o canal medular foi lavado com auxílio de seringa contendo meio de cultivo (DMEM-High) e antibiótico (estreptomicina a 1%).

5.2 CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA

Todas as células que foram coletadas da medula óssea, foram cultivadas em placa de cultivo de 30mm de diâmetro onde após um período de 24 horas, passado este intervalo, o sobrenadante foi desprezado (meio de cultivo + células flutuantes) e a placa de cultivo lavada 02 vezes com PBS-L, a fim que permanecessem apenas as células aderentes da medula óssea. Todas as placas foram então incubadas sob a mesma atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

Foi utilizado o meio de cultivo composto de DMEM – HIGH, 1% de estreptomicina, 1 % de Piruvato, 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de aminoácidos não essenciais

5.3 SELEÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS – CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DO ANIMAL NO ESTUDO

Foram escolhidos 10 cães, de proprietários provenientes de várias clínicas veterinárias particulares da região de Guarulhos, com fraturas diafisárias de rádio e ulna.

Os animais selecionados apresentaram os critérios a seguir:

- impotência funcional do membro acometido;
- idade de 01 a 05 anos;
- local da fratura terço distal (para esta consideração, será tomado como parâmetro o comprimento total do osso, sendo igualmente subdividido em 03 partes iguais, onde a parte mais distal será a considerada para a pesquisa) sendo esta fratura fechada, simples, transversa ou oblíqua, sendo o diagnóstico feito através de radiografia;
- Tempo de fratura de 01 a 07 dias;
- Peso 01- 08 kg.

Os cães foram divididos em 02 grupos (A e B) de 05 animais:

Grupo A: foi realizada correção cirúrgica com placa e parafuso bloqueado.

Grupo B: realizada correção cirúrgica com placa e parafuso bloqueado + aplicações de células tronco de medula óssea fetal canina no foco da fratura com auxílio de um aparelho de fluoroscopia (arco-cirúrgico) a cada 15 dias (iniciando a primeira aplicação no dia da cirurgia e as outras 3 a cada 15 dias) num total de 04 aplicações.

No local da aplicação, foi feita assepsia com clorexidine alcoólico 0,5%, onde foi introduzida uma agulha 20 x 5,5 guiada por fluroscopia ao foco de fratura, onde foram aplicadas as células de medula óssea canina (foram injetadas 10^6 células por aplicação por animal do grupo). Para a avaliação dos resultados adotamos o estudo temporal aos 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 120 dias de pós-operatório. Foram coletados os dados de anamnese do animal e exame físico antes e após o tratamento. Para

análise dos aspectos físicos, foi realizada foto-documentação e filmagens do animal antes, durante e após tratamento. Foram avaliados também os exames laboratoriais, como hemograma completo e exames bioquímicos. Os aspectos radiográficos da evolução do tratamento foram realizados por radiografias da região afetada. Foi realizada radiografia controle no pós-cirúrgico imediato, e depois com 15 dias e a cada 30 dias, perfazendo um total de 06 radiografias controle em duas posições: craniocaudal e mediolateral.

Os animais ficaram em repouso (“semi-confinamento”) até a total ausência linha da fratura. Os dois grupos animais operados, com e sem aplicação de células foram acompanhados com os mesmos exames radiográficos, e seus resultados comparados após o término das análises. A funcionabilidade do membro operado foi avaliada seguindo padrões descritos a seguir. Foi observado o comportamento do membro operado com o animal em posição quadrupedal e em movimento. A fim de possibilitar padronização dos resultados, estes foram divididos em três graus: grau I de funcionabilidade denominado: “impotência”, e indica que o animal não apoia o membro operado em nenhum momento no exame clínico; o grau II, denominado como “regular” e indica que o animal não apoia o membro em estação, mas quando exigido apoia normalmente; o grau III foi denominado “bom” e indica que o membro operado pode ser apoiado normalmente, tanto em estação como em movimento. Os proprietários assinaram termo de compromisso (anexo 01) em que afirmaram estar de acordo com o procedimento e cientes de todos os riscos inerentes à cirurgia e aplicação de células-tronco.

5.4 EXAMES COMPLEMENTARES

Os animais foram submetidos a todos os exames pré-operatórios convencionais (hemograma, ALT, AST, ureia, creatinina), além de radiografia do membro afetado. Quando necessário, foram submetidos também a exame de eletrocardiograma e ultrassom abdominal.

5.4.1 Técnica Radiográfica simples

Para a realização das radiografias do membro anterior acometido, foram feitas duas projeções, craniocaudal e médio-lateral. A técnica radiográfica foi adequada através da relação quilovoltagem, miliamperagem e espessura da área corporal a ser radiografada. Todos os exames de radiologia foram feitos no Hospital Veterinário Arca de Noé, com o aparelho de raios-x marca Agfa, modelo CR10-X.

5.4.2 Exames laboratoriais

- Hemograma completo (Equipamento: Roche Sysmmex poch-100i);
- Creatinina, Uréia, ALT, AST (Equipamento: Bioplus 200).

Todos os exames de patologia clínica foram feitos no Hospital Veterinário Arca de Noé, sendo o hemograma realizado por meio do equipamento Roche Sysmmex poch-100i, e os testes bioquímicos pelo equipamento Bioplus 200.

5.4.3 Fluoroscopia (arco cirúrgico)

Durante o ato cirúrgico, e em todas as aplicações de célula-tronco mesenquimais no foco de fratura, este equipamento foi utilizado para a garantia da localização precisa da aplicação das células-tronco, e para o posicionamento do membro nas cirurgias, e colocação dos implantes. A técnica fluoroscópica foi adequada através de relação de quilovoltagem, miliamperagem e espessura da área a ser avaliada.

Figura 1 - Paciente anestesiado durante o exame de fluoroscopia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Exame de fluoroscopia em paciente anestesiado com isoflurano.

Todos os exames foram feitos no Hospital Veterinário Arca de Noé, sendo o aparelho da marca Siemens (Modelo 844394765256, Alemanha).

5.4.4 Intervenção Cirúrgica – Osteossíntese de rádio e ulna em cães com uso de placa bloqueada em T e transplante de células-tronco

Os animais receberam, 48 horas antes da cirurgia, Cefalexina 30mg/kg BID, Tramal 2mg/kg/tid, Cetoprofeno 1mg/kg/SID e ficaram imobilizados com tala de Robert Jones.

Após incisão cutânea na face crânio-medial da região distal do rádio e da ulna, seguida de localização, isolamento e afastamento dos tendões dos músculos extensor do carpo-ulnar e extensor digital lateral e dos músculos extensor longo dos dedos e da cabeça ulnar do músculo flexor digital profundo. Foram iniciados, então, os procedimentos de redução e alinhamento dos fragmentos da fratura, depois a placa será minimamente moldada com auxílio de retorcedor manual. Com instrumento específico “dispositivo de redução”, a placa foi fixada no fragmento distal, e depois no fragmento proximal. Em seguida, foi colocado o guia para broca

1,5mm na porção distal do osso e perfurado com o auxílio de broca 1,5 mm para placa 2,0 mm (Engiplan Ind. Implantes, Rio Claro – SP), até perfurar o osso (sendo sempre irrigado com soro fisiológico, para evitar aquecimento ósseo). Em seguida, a profundidade do orifício foi aferida com o medidor de profundidade; o parafuso rosqueante 2,0 mm foi inserido com chave até prender se a placa.

Após fixação dos parafusos, o “dispositivo de redução” é removido e o último parafuso foi preso.

A sutura dos planos cirúrgicos foi realizada segundo os padrões cirúrgicos consagrados (musculatura, tecido celular subcutâneo e pele por pontos simples separados, com utilização de fio de náilon monofilamento - Bioline Fios Cirúrgicos Ltda, Anápolis – Goiânia). Após o término dos procedimentos, os membros foram imobilizados com bandagens de Robert Jones.

Figura 2 - Fotografias referentes à conduta operatória adotada

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Protocolo cirúrgico. Em A observamos o paciente já anestesiado, com o membro em fadiga, em B notamos a colocação da placa ortopédica, em C a aplicação dos parafusos, e em D a imagem da fluoroscopia no trans-operatório.

5.5 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E CONTROLE DE DOR

Reposição hídrica com fluido de Ringer com lactato (Bolsa de 250 ml, HalexIstar Ind.Farm. Br 153 Km 3 Goiânia-GO), 10ml/kg/hora no trans- operatório, medicação pré- anestésica com 0,05 mg/Kg de acepromazina (Acepran 0,2% frasco 20ml, Vetnil Ind. e Com. de Pro. Vet. Ltda, Louveira – São Paulo – BR), 0,5 mg/kg de morfina (Dimorf 10mg/ml – Cristália Prod. Qui. e Farm. Rod. Itapira – Línioia – SP, Brasil), Indução com 3mg/kg de Propofol (Propovan 10mg/ml, frasco 20 ml, Cristália Prod. Qui. e Farm. Rod. Itapira – Línioia – SP, Brasil), 1 mg/Kg de Cetamina (Cetamina 10%, frasco 10 ml Vetnil Ind. e Com. de Prod. Vet. Ltda, Louveira – São Paulo – Brasil), e manutenção com Isoflurano (Isoflorano Genérico frasco 100ml, Laboratório Biochimico Ind. Farm. Limitada, Itatiaia, RJ).

5.6 MEDICAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

1) Cefalexina (Cefalexina 500 mg, Laboratório Medley, São Paulo-SP, Brasil) na dose de 30 mg/Kg a cada 12 horas durante 15 dias.

2) Cloridrato de tramadol (Cloridrato de tramadol 50 mg, laboratório Libbs Farm. LTDA, São Paulo – SP, Brasil), na dose de 2 mg/kg a cada 08 horas por cinco dias.

3) Cetoprofeno (ketojet 5 mg, Laboratório Agener União Química Saúde Animal, São Paulo – SP, Brasil), na dose de 1 mg/Kg a cada 24 horas por cinco dias de e permaneceram com o membro imobilizado com tala de *Robert Jones*.

5.7 ESTUDO COMPLEMENTAR COM COELHOS DA NOVA ZELÂNDIA – AVALIAÇÃO DO *HOMING* DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA INJETADAS NO LOCAL DA FRATURA

O objetivo deste estudo foi complementar e aumentar o número de avaliações para que se possa responder a pergunta da pesquisa com mais propriedade, pois além das avaliações de marcha com fotos e filmagem dos cães em estudo, exames

laboratoriais e radiologia, poderíamos melhorar a qualidade do nosso trabalho com animais de pesquisa, no caso, os coelhos. Utilizamos as mesmas células de medula óssea que foram aplicadas nos cães. Propomos este estudo com coelhos para que se faça o estudo histológico no local da osteotomia em diferentes tempos, com 15, 30, e 60 dias de evolução da cicatrização, um dado relevante para o estudo em questão.

Este estudo virá enriquecer e complementar a o trabalho realizado com os cães, com dados complementares sobre as células que estão sendo utilizadas e como estas, de fato, podem agir e auxiliar no processo de cicatrização óssea e auxiliar a medicina veterinária regenerativa.

5.7.1 Utilização de esponja de colágeno como scaffold para aplicação de células tronco

Em um dos grupos animais, o G3, utilizaremos uma esponja de colágeno (Hemospon, TechNew), como scaffold para as células tronco de medula óssea. As células foram cultivadas com a esponja para que estas possam aderir e se propagar nesta matriz de colágeno. Após 72h, esta esponja foi retirada do meio de cultura, lavada delicadamente com PBS estéril e implantada no foco da fratura. Com esta estratégia, pretendemos analisar se as células permaneceram no foco da lesão e tornaram o procedimento mais eficiente.

5.7.2 Tratamento “*in vivo*” das fraturas

O experimento foi conduzido no Hospital Veterinário Arca de Noé, em Guarulhos, juntamente com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, no Departamento de Anatomia dos animais domésticos e silvestres, onde as células tronco serão preparadas para a aplicação. Foram utilizados 12 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, com peso médio de 3,5 Kg e idade entre 05 e 06 meses, jovens adultos.

5.7.3 Grupos Animais

Os coelhos foram divididos em 04 grupos (A, B, C e D) de 03 animais, sendo realizada a falha óssea nos 04 grupos.

Grupo A: (Controle) Foi realizada somente a cirurgia convencional com placa para correção da fratura. Neste grupo foi realizada a cirurgia de ostectomia, esta técnica consiste em promover uma falha óssea no rádio direito de 1,0 cm, a partir de 2,0 cm da articulação radio-ulnar- cárpica e o uso de um implante de inox, placa e parafuso bloqueado.

Grupo B: Foi realizada a cirurgia de ostectomia e enxerto e os animais somente receberam o scaffold para controle quanto à influência do biomaterial na recuperação do animal.

Grupo C: foi realizada a cirurgia de ostectomia e enxerto, com falha óssea no rádio direito de 1,0 cm, a partir de 2,0 cm da articulação radio-ulnar-cárpica, e posteriormente, os animais receberam as aplicações de células tronco aplicadas no scaffold (esponja cirúrgica) .

Grupo D: realizada a cirurgia de ostectomia, os animais receberam as aplicações de células tronco no foco da fratura, foram realizadas 3 aplicações de células. Neste grupo será realizada a cirurgia de ostectomia e enxerto, com falha óssea no rádio direito de 1,0 cm, a partir de 2,0 cm da articulação radio-ulnar-cárpica, e posteriormente feita aplicação de células-tronco de feto de cão, no dia da cirurgia, com 15 e 30 dias de pós cirúrgico.

5.7.4 Procedimento Cirúrgico

A falha óssea foi induzida cirurgicamente, em rádio direito, pela remoção de um segmento osteoperiosteal em todo seu diâmetro, com dez milímetros de comprimento, localizado a 2,0cm da articulação rádio-ulnar-cárpica, por intermédio de serra oscilante (Serra Sagital –Bojin –Xangai China). As extremidades das falhas foram inspecionadas, e lavadas com solução fisiológica.

Os exames complementares foram feitos em todos os grupos (hemograma, uréia, creatinina, AST, ALT e radiografia controle nas posições craniocaudal e látero-medial de rádio e ulna direita com 15, 30, e 60 dias de pós operatório), além da radiografia controle no pós-cirúrgico imediato em todos os animais do experimento. A aplicação das células-tronco foi realizada nos grupos B no dia da cirurgia, e também com 15 dias e 30 dias de pós-operatório, com auxílio do fluoroscópio (fabricante BOJIN Xangai – China).

Todos os animais foram eutanasiados com o protocolo: sedação 30mg/kg quetamina (Cetamina 10%, frasco 10 ml Vetnil Ind. e Com. de Prod. Vet. Ltda, Louveira – São Paulo – Brasil) + 2mg/kg de midazolam (dormire 5mg/5ml – Cristália Prod. Qui. e Farm. Rod. Itapira – Lindoia – SP, Brasil) IM, acessar o vaso da orelha e administrar 10 mg/kg Propofol (Propovan 10mg/ml, frasco 20 ml, Cristália Prod. Qui. e Farm. Rod. Itapira – Lindoia – SP, Brasil), e manutenção com Isoflurano), seguido de 10 ml KCL, em intervalos de 15, 30 e 60 dias de pós operatório para avaliar e evolução do tratamento. Após a eutanásia, o rádio e a ulna foram dissecados, e avaliou-se a presença ou ausência de preenchimento da falha, bem como a cicatrização do tecido mole adjacente. Foi realizado o exame histológico no rádio e ulna dos animais, para que a certificação de que os fragmentos ósseos avaliados envolveram a área de enxertia e tecido ósseo remanescente proximal e distal, que foram corados por *Azul de Stevenels*. Foi realizada avaliação histológica para observarmos se houve o preenchimento da falha e as características do tecido presente.

A aplicação de células-tronco foi feita com auxílio de aparelho de fluoroscopia (arco cirúrgico) a cada 15 dias (iniciando a primeira no dia da cirurgia e as outras duas a cada 15 dias, num total de 03 aplicações. No local da aplicação foi feita assepsia com clorexidine alcoólico 0,5 % onde foi introduzida uma agulha 20 x 5,5 guiada por arco cirúrgico no foco de fratura, onde foram aplicadas as células de medula óssea canina. Serão inoculadas 10^6 células por aplicação, por animal do grupo. Os animais foram contidos quimicamente, com 35 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Cetamina 10%, frasco 10 ml Vetnil Ind. e Com. de Prod. Vet. Ltda, Louveira – São Paulo – Brasil) e 2 mg/Kg de maleato de midazolam por via intramuscular (IM).

Os coelhos utilizados neste experimento foram alojados em baias individuais, com livre acesso a água e alimento(ração) durante todo o período experimental. As

gaiolas destes animais foram diariamente limpas, e os animais passaram por avaliação clínica a cada 15 dias, tanto para observação dos resultados do tratamento experimental, quanto para avaliação de dor.

5.7.5 Procedimento anestésico e controle de dor

Foi realizada reposição hídrica com fluido de Ringer com lactato (Bolsa de 250 ml, HalexIstar Ind.Farm. Br 153 Km 3 Goiânia-GO) 10ml/Kg/hora no trans-operatório, medicação pré-anestésica 35 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Cetamina 10%, frasco 10 ml Vetnil Ind. e Com. de Prod. Vet. Ltda, Louveira – São Paulo – Brasil) e 2 mg/Kg de maleato de midazolam por via intramuscular (IM). Posteriormente, os animais foram colocados com o pescoço em ventroflexão e intubados com sonda endotraqueal 2,5, sendo mantidos em sistema aberto do tipo “baraka”. A veia auricular foi canulada no caso de necessidade de doses de reforço anestésico, bem como a artéria auricular central, para monitoração da pressão arterial média dos animais, e manutenção com Isoflurano (Isoflorano Genérico frasco 100ml, Laboratório Biochimico Ind. Farm. Limitada, Itatiaia, RJ).

5.7.6 Conduta operatória

Em relação às osteossínteses, após depilação e preparo rotineiro do campo operatório, foi realizada a incisão cutânea na face crânio-medial da região distal do rádio e ulna. A seguir, foi efetuada a divulsão dos tecidos subjacentes, localização, isolamento e afastamento dos tendões. Uma falha óssea foi induzida cirurgicamente, em rádio direito, pela remoção de um segmento osteoperiosteal em todo seu diâmetro, com dez milímetros de comprimento, localizado a 2,0cm da articulação rádio-ulnar- cárpica, por intermédio de serra oscilante (Serra Sagital –Bojin –Xangai China). As extremidades das falhas foram inspecionadas, lavadas com solução fisiológica. Terminada esta etapa operatória, realizamos a técnica de colocação de placa e parafusos ósseos em todos os grupos.

5.7.7 Técnica de placa bloqueada

Após “alinhamento falha óssea”, a placa foi minimamente moldada com auxílio de retorcedor manual. Fixa-se a placa com uma espanhola e perfura-se o osso com auxílio de broca 1,0 mm com guia, para placa 1,5 mm reta 07 furos inox 316 L (Engiplan Ind. Implantes, Rio Claro – SP), afere-se a profundidade do orifício com medidor de profundidade e o parafuso rosqueante 1,5 foi inserido com chave até prender-se à placa. A sutura dos planos cirúrgicos foi realizada segundo os padrões cirúrgicos consagrados: musculatura, tecido subcutâneo e pele por pontos simples separados, com utilização de fio de náilon monofilamento 3-0 (Bioline Fios Cirúrgicos Ltda, Anápolis – Goiânia. Após o término dos procedimentos, os membros foram imobilizados com bandagens de Robert Jones.

5.7.8 Medicação pós-operatória

- 1) Enrofloxacin (enrofloxacin 2,5%, frasco 20 ml (Laboratórios Vencofarma do Brasil.) 5mg/kg, a cada 24 horas, por 10 dias.
- 2) Cloridrato de tramadol (Cloridrato de tramadol 50 mg, laboratório Libbs Farm. LTDA), na dose de 2 mg/kg a cada 08 horas por cinco dias.
- 3) Cetoprofeno (Ketojet 100 mg frasco 50 ml, Laboratório Agener União Química Saúde Animal), na dose de 1 mg/Kg a cada 24 horas por cinco dias de e permaneceram com o membro imobilizado com tala de *Robert Jones*.

5.7.9 Preparação do material para o procedimento histológico

Após a eutanásia dos animais de todos os grupos, foram coletados fragmentos ósseos das extremidades das falhas ósseas, e armazenados em formol 4%. Todas as amostras foram devidamente identificadas. Após 7 dias as amostras foram lavadas em água corrente para eliminar o excesso de fixador. Promoveu-se então a desidratação do tecido de forma a possibilitar a posterior infiltração da

resina. Iniciamos a desidratação com álcool a 30% e as trocas seguintes em 40, 70, 95 e 100% por mais dois dias. Depois, realizou-se a diafanização das amostras, permanecendo em xilol por 4 dias, realizando uma troca a cada 2 dias. Primeiramente foi realizada uma solução resinosa constituída 85% de MMT (Merck n.800590) e 15% de Dibutilfitalato (Merck n.814157). Obteve-se uma mistura homogênea em capela de fluxo laminar. As amostras permaneceram em geladeira nesta solução por 2 dias.

Após este período foi preparada uma solução a 85% de MMA, 15% de DF e 1g de peróxido de benzoíla PB (Sigma B2030). As amostras permaneceram nesta solução por mais 2 dias em geladeira. Para a inclusão do material preparou-se uma solução com 85% de MMA, 15% de DF e 3g de PB. O material sofre polimerização em 3 dias quando armazenado em estufa a 37°C. A microtomia foi realizada utilizando-se micrótomo com disco (Vara-cut Leco). As secções obtidas apresentavam cerca de 300µm e foram polidas, debastadas com lixas d'água até atingirem 100µm.

Coloração

Previamente foi realizada uma suave descalcificação da superfície da lâmina com ácido fórmico a 1% durante 1 minuto e meio, para melhor penetração do corante.

Preparo dos corantes

Azul de Stevenels:

1g de azul de metileno + 75ml de água destilada

1,5g de permanganato de potássio + 75ml de água destilada

Misturou-se e filtrou-se as duas soluções

Alizarina Red S31:

100ml de água destilada + 2g de Alizarina Red S

As secções foram previamente coradas com Azul de Stevenels e contracoradas com Alizarina Red S. A Alizarina Red corou o cálcio nos tecidos mineralizados enquanto os demais tecidos permaneceram corados pelo Azul de Stevenels.

6 RESULTADOS

6.1 ANIMAIS – CÃES

Foram realizadas cirurgias de redução de fratura de rádio e ulna distal em 10 cães, com colocação de placa ortopédica e parafusos, sendo que em 5 animais foi utilizada a aplicação de células-tronco (Grupo B), e os outros 5 animais ficaram no grupo controle (Grupo A). Destes, o 3º animal do grupo B apresentou fístula no local da cirurgia, e necessitou de nova cirurgia para remoção dos implantes, e o 1º e o 5º animal do grupo B abandonaram o tratamento. A descrição dos grupos está organizada nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Grupo A – controle: Animais com fratura distal de rádio e ulna que passaram por cirurgia ortopédica

Animal	Idade	Raça	Peso	Diagnóstico
A1	4 anos	SRD	6,5 Kg	Fratura distal de rádio e ulna
A2	1 ano	Pinscher	2,1 Kg	Fratura distal de rádio e ulna
A3	1 ano	Pinscher	2,9 Kg	Fratura distal de rádio e ulna
A4	2 anos	Pinscher	3,1 Kg	Fratura distal de rádio e ulna
A5	2 anos	SRD	2,7 Kg	Fratura distal de rádio e ulna

Fonte: DORA (2014)

Tabela 2 - Grupo B: Animais com fratura distal de rádio e ulna que passaram por cirurgia ortopédica e aplicação de células-tronco

Animal	Idade	Raça	Peso	Diagnóstico
B1	2 anos	SRD	9,5 Kg	Fratura distal de rádio e ulna
B2	1 ano	Poodle	6,8 Kg	Fratura distal de rádio e ulna
B3	1 ano	SRD	11 Kg	Fratura distal de rádio e ulna
B4	1 ano	Pinscher	2,7 Kg	Fratura distal de rádio e ulna
B5	1 ano	Pinscher	2,6 Kg	Fratura distal de rádio e ulna

Fonte: DORA (2014)

6.1.1 Grupo Controle (A)

Grupo Controle (A) - Animal 1

A paciente chegou ao atendimento com histórico de dois dias de fratura, em decorrência de atropelamento por automóvel, com bom estado geral (Figura 1 e 2);(Tabela 1 e 2).

Figura 3 - Animal A1: durante primeiro atendimento

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal A1: primeiro atendimento, com histórico de trauma. Em A, ainda com a bandagem feita por outro estabelecimento veterinário; em B, aspecto do membro sem a bandagem

Figura 4 - Animal A1: radiografia pré-operatória

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal A1: radiografia simples, com fratura distal de rádio e ulna, em duas incidências. (A) incidência lateral; (B) incidência craniocaudal

Tabela 3 - Hemograma do animal A1 – Período pré-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	6,43	5,5 a 8,5	X10 ⁶ /L
Hemoglobina	16,2	12 a 18	g/dL
Hematócrito	46,7	37 a 55	%
Proteínas Totais	7,4	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	6.000	6.000 a 17.000	10 ³ /mL
Eosinófilos	120	100 a 1.250	10 ³ /mL
Linfócitos	900	1.000 a 4.800	10 ³ /mL
Granulócitos	4.980	5.000 a 13.500	10 ³ /mL
Plaquetas	306.000	160.000 a 500.000	10 ³ /mL

Fonte: DORA (2014)

Tabela 4 - Exames bioquímicos do animal A1 – Período pré-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,6	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	21	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	41	5 a 85	U/L
AST	36	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 5. Animal A1: Trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal A1: durante a cirurgia de redução da fratura e colocação de placa ortopédica.

Figura 6 - Animal A1: Trans-operatório – fluoroscopia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal A1: durante a cirurgia de redução da fratura com uso de fluoroscopia, em incidência médio-lateral.

Figura 7 - Animal A1: Radiografia – Pós-operatório imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal A1: (A) incidência craniocaudal; (B) incidência lateral

Tabela 5 - Animal A1: Hemograma - 30 dias de pós-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	6,87	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	16,5	12 a 18	g/dL
Hematócrito	49,6	37 a 55	%
Proteínas Totais	6,8	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	5.600	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	300	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	1.700	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	3.600	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	345.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 6 - Animal A1: Exames bioquímicos - 30 dias de pós-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,7	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	19	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	20	5 a 85	U/L
AST	31	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 8 - Animal A1: Radiografia após cicatrização, 45 dias após a cirurgia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal A1: ausência da linha de fratura no rádio. (A) incidência lateral; (B) incidência craniocaudal.

Tabela 7 - Animal A1: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom

	30 dias	60 dias	90 dias
Animal 1 – Grupo A	II	II	II

Fonte: DORA (2014)

Este paciente teve uma evolução do quadro satisfatória, com a consolidação óssea adequada em 60 dias e ausência da linha de fratura no rádio; porém apresentou claudicação intermitente em todo o período pós-operatório. Sendo

assim, ficou determinada a retirada do implante ortopédico, o que resultou em completa recuperação e ausência de sinais clínicos após 150 dias.

Grupo Controle (A) - Animal 2

Animal com histórico de queda e fratura há 03 dias.

Figura 9 - Animal A2: radiografia pré-operatória

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Duas incidências, sendo A em incidência lateral, e B em incidência craniocaudal.

Tabela 8 - Animal A2: Hemograma – Período pré-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	6,7	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	16,6	12 a 18	g/dL
Hematócrito	43,3	37 a 55	%
Proteínas Totais	6,5	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	9.900	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	0	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	2.673	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	7.227	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	209.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 9 - Animal A2: Exames bioquímicos – Período pré-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,8	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	45	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	89	5 a 85	U/L
AST	100	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 10 - Animal A2:Trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Cirurgia de redução da fratura. Em A, o paciente com fadiga do membro, e já anestesiado; em B, a colocação da placa ortopédica.

Figura 11 - Animal A2:Trans-operatório – fluoroscopia

Fonte: DORA, A.B. (2014)

Legenda: Cirurgia de redução da fratura com uso de fluoroscopia.

Figura 12 - Animal A2: Radiografia – Pós-operatório imediato.

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Incidência craniocaudal em A, e lateral em B.

Tabela 10 - Animal A2: Hemograma - 30 dias de pós-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	7,4	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	18,2	12 a 18	g/dL
Hematócrito	51,5	37 a 55	%
Proteínas Totais	7,1	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	19.900	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	1.800	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	2.100	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	16.000	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	459.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 11 - Animal A2: Exames bioquímicos - 30 dias de pós-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,5	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	131	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	94	5 a 85	U/L
AST	47	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 13 - Animal A2: Radiografia após cicatrização, 45 dias após a cirurgia

Fonte: DORA, A.B. (2014)

Legenda: Sem a visibilização da linha de fratura, sendo A em incidência lateral, e B em incidência craniocaudal.

Tabela 12 - Animal A2: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom

	30 dias	60 dias	90 dias
Animal 2 – Grupo A	III	III	III

Fonte: DORA (2014)

O paciente não apresentou nenhuma intercorrência pós-operatória, com boa evolução do quadro, e ausência de claudicação em todo o pós-operatório.

Grupo Controle (A) - Animal 3

Figura 14 - Animal A3: durante o primeiro atendimento, e radiografia pré-operatória. Histórico de queda do colo do responsável há 4 dias

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Durante o atendimento (A), radiografia simples da fratura em incidência craniocaudal (B), e radiografia em incidência lateral (C)

Tabela 13 - Animal A3: Hemograma – Período pré-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	8,6	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	19,8	12 a 18	g/dL
Hematócrito	52,7	37 a 55	%
Proteínas Totais	6,0	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	11.200	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	00	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	1.904	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	9.296	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	366.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 14 - Animal A3: Exames bioquímicos – Período pré-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,3	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	48	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	73	5 a 85	U/L
AST	70	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 15 - Animal A3:Trans-operatório

Fonte: DORA, A.B. (2014)

Legenda: Animal 3 do Grupo A durante cirurgia ortopédica, com a colocação da placa

Figura 16 - Animal A3: Trans Trans-operatório – fluoroscopia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Fluoroscopia trans-operatória do animal 3 do grupo A. A seta amarela indica a linha de fratura

Figura 17 - Animal A3: Radiografia – Pós-operatório imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia simples do paciente. Em A, imagem em incidência lateral; em B, craniocaudal

Tabela 15 - Animal A3: Hemograma - 30 dias de pós-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	7,7	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	17,3	12 a 18	g/dL
Hematócrito	52,1	37 a 55	%
Proteínas Totais	6,6	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	10.500	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	105	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	2.415	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	7.980	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	352.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 16 - Animal A3: Exames bioquímicos - 30 dias de pós-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,5	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	63	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	83	5 a 85	U/L
AST	36	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 18 - Animal A3: Radiografia após cicatrização, 90 dias após a cirurgia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Incidência lateral do paciente 3 do Grupo A, após consolidação óssea. Verificar a presença de linha de fratura na ulna, mas a sua ausência no rádio. Incidência craniocaudal em A, e lateral em B

Tabela 17 - Animal A3: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom

	30 dias	60 dias	90 dias
Animal 3 – Grupo A	III	III	III

Fonte: DORA (2014)

O terceiro animal do grupo 3 teve boa recuperação cirúrgica, e bom resultado pós-operatório, com a ausência da linha de fratura e bom apoio do membro em todo o processo.

Grupo Controle (A) - Animal 4

Figura 19 - Animal A4: durante o primeiro atendimento. Queda do colo

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 4 do Grupo A. Em A, o aspecto do paciente com impotência funcional do membro torácico direito; em B, imagem mais detalhada do membro, com fratura de rádio e ulna distal

Figura 20 - Animal A4: radiografia pré-operatória

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia simples do paciente 4 do Grupo A, em incidências craniocaudal (A) e lateral (B)

Tabela 18 - Animal A4: Hemograma – Período pré-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	6,23	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	15,5	12 a 18	g/dL
Hematócrito	39,9	37 a 55	%
Proteínas Totais	6,2	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	14.100	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	0	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	1.833	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	12.267	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	319.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 19 - Animal A4: Exames bioquímicos – Período pré-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,5	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	79	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	94	5 a 85	U/L
AST	40	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 21 - Animal A4: Trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 4 do Grupo A durante cirurgia ortopédica. Redução cirúrgica do foco de fratura, com bom alinhamento dos fragmentos

Figura 22 - Animal A4: Trans-operatório – fluoroscopia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Fluoroscopia trans-operatória do animal 4 do grupo A, em incidência latero-medial, para avaliar a colocação de implante ortopédico

Figura 23 - Animal A4: Radiografia – Pós-operatório imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 4 do Grupo A – radiografia no pós-operatório imediato. Em A, incidência craniocaudal, em B, lateral. A seta indica a presença da linha de fratura

Tabela 20 - Animal A4: Hemograma - 30 dias de pós-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	7,7	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	18,8	12 a 18	g/dL
Hematócrito	54	37 a 55	%
Proteínas Totais	6,8	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	10.800	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	0	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	1.728	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	9.072	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	364.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 21 - Animal A4: Exames bioquímicos - 30 dias de pós-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	1,1	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	54	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	78	5 a 85	U/L
AST	47	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 24 - Animal A4: Radiografia após cicatrização, 90 dias após a cirurgia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Raio-x do paciente 4 do Grupo A. Incidências lateral (A), com a observação da linha de fratura na ulna e sua ausência no rádio; e craniocaudal (B)

Tabela 22 - Animal A4: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom

	30 dias	60 dias	90 dias
Animal 4 – Grupo A	III	III	III

Fonte: DORA (2014)

Este paciente evoluiu bem, com boa recuperação cirúrgica, e bom resultado pós-operatório, com a ausência da linha de fratura e bom apoio do membro em todo o processo.

Grupo Controle (A) - Animal 5

Figura 25 - Animal A5: durante o primeiro atendimento

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 5 do Grupo A. Em A, paciente com fratura de rádio e ulna direita, em impotência funcional; em B, visão lateral da fratura

Figura 26 - Animal A5: radiografia pré-operatória

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia simples do animal 5 do Grupo A, com fratura distal de rádio e ulna. Incidências craniocaudal (A) e lateral (B)

Tabela 23 - Animal A5: Hemograma – Período pré-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	6,3	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	15,5	12 a 18	g/dL
Hematócrito	40,9	37 a 55	%
Proteínas Totais	5,7	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	8.600	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	0	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	774	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	7.654	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	358.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 24 - Animal A5: Exames bioquímicos – Período pré-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,6	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	56	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	52	5 a 85	U/L
AST	31	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 27 - Animal A5: Trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 5 do Grupo A durante cirurgia ortopédica, com a colocação de placa e parafusos, com bom alinhamento dos fragmentos

Figura 28 - Animal A5: Trans-operatório – fluoroscopia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Fluoroscopia trans-operatória do animal 5 do grupo A. A seta indica a linha de fratura

Figura 29 - Animal A5: Radiografia – Pós-operatório imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia do paciente 5 do Grupo A, imediatamente após a cirurgia ortopédica, sendo (A) incidência lateral; (B) incidência craniocaudal. Notar a linha de fratura indicada na figura

Tabela 25 - Animal A5: Hemograma - 30 dias de pós-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	6,06	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	14,7	12 a 18	g/dL
Hematócrito	38,8	37 a 55	%
Proteínas Totais	5,4	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	15.400	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	308	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	3.696	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	11.396	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	337.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 26 - Animal A5: Exames bioquímicos – 30 dias de pós-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,6	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	62	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	57	5 a 85	U/L
AST	50	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 30 - Animal A5: Radiografia após cicatrização, 75 dias após a cirurgia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia simples evidenciando a completa cicatrização da fratura, sendo (A) em incidência lateral, e (B) em incidência craniocaudal; a seta indica a linha de fratura na ulna, porém nenhuma linha de fratura no rádio

Tabela 27 - Animal A5: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom

	30 dias	60 dias	90 dias
Animal 5 – Grupo A	III	III	III

Fonte: DORA (2014)

Houve boa recuperação do animal, com a ausência da linha de fratura e bom apoio do membro em todo o processo.

6.1.2 Grupo Tratamento (B)

Grupo Tratamento (B) - Animal 1

A paciente chegou ao atendimento com histórico de dois dias de fratura bilateral de rádio e ulna, em decorrência de atropelamento por automóvel, com bom estado geral.

Figura 31 - Animal B1: durante o primeiro atendimento. Fratura bilateral de rádio e ulna

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Primeiro atendimento, com histórico de trauma. Fratura bilateral de rádio e ulna

Figura 32 - Animal B1: radiografia pré-operatória de ambos os membros

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Primeira radiografia, com fratura distal de rádio e ulna de membro torácico direito, em duas incidências, sendo A em incidência lateral, e B em incidência craniocaudal. (C) incidência de membro torácico esquerdo, e (D) incidência de membro torácico esquerdo

Tabela 28 - Animal B1: Hemograma – Período pré-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	8,2	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	20,3	12 a 18	g/dL
Hematócrito	54,6	37 a 55	%
Proteínas Totais	8,2	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	14.000	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	0	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	1.670	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	12.320	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	352.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 29 - Animal B1: Exames bioquímicos – Período pré-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	1,3	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	40	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	62	5 a 85	U/L
AST	40	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 33 - Animal B1: Trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Durante a cirurgia de redução da fratura

Figura 34 - Animal B1: Trans-operatório – fluoroscopia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Paciente durante a cirurgia de redução da fratura com uso de fluoroscopia. Observamos a colocação do parafuso através do exame.

Figura 35 - Animal B1: Radiografia – Pós-operatório imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 1 do Grupo B, no pós-operatório imediato, em incidência craniocaudal em A, e incidência lateral em B.

Tabela 30 - Animal B1: Hemograma - 30 dias de pós-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	6,7	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	15,8	12 a 18	g/dL
Hematócrito	45	37 a 55	%
Proteínas Totais	7,0	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	12.800	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	128	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	1.920	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	10.752	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	469.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 31 - Animal B1: Exames bioquímicos – 30 dias de pós-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,8	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	28	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	68	5 a 85	U/L
AST	59,3	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Tabela 32 - Animal B1: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom

	30 dias	60 dias	90 dias
Animal 1 – Grupo B	II	---	---

Fonte: DORA (2014)

Figura 36 - Animal B1: Radiografia após cicatrização, 45 dias após a cirurgia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Grupo B animal 1: verificar a presença de linha de fratura nas radiografias. (A) membro torácico direito, incidência craniocaudal; (B) membro torácico direito, incidência lateral; (C) membro torácico esquerdo, incidência craniocaudal; (D) membro torácico esquerdo, incidência lateral

Aos 45 dias de pós-operatório, o animal ainda apresentava linha de fratura pela radiografia, porém a responsável não compareceu mais aos retornos com o animal.

Grupo Tratamento (B) - Animal 2

Animal com histórico de atropelamento por motocicleta.

Figura 37 - Animal B2: durante o primeiro atendimento

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Primeiro atendimento, com fratura distal de rádio e ulna esquerdos

Figura 38 - Animal B2: radiografia pré-operatória

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografias em incidências latero-medial (A) e craniocaudal (B) do animal 02 do Grupo B, evidenciando a linha de fratura

Tabela 33 - Animal B2: Hemograma – Período pré-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	5,6	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	12,6	12 a 18	g/dL
Hematócrito	34,3	37 a 55	%
Proteínas Totais	7,0	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	17.000	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	0	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	1.989	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	14.110	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	263.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 34 - Animal B2: Exames bioquímicos – Período pré-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,8	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	32	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	30	5 a 85	U/L
AST	15	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 39 - Animal B2: Trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 2 do Grupo B, no trans-operatório, durante a cirurgia de redução da fratura

Figura 40 - Animal B2: Trans-operatório – fluoroscopia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 2 do Grupo B, no trans-operatório, durante a cirurgia de redução da fratura com uso de fluoroscopia. Nota-se a linha de fratura pela seta

Figura 41 - Animal B2: Radiografia – Pós-operatório imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 2 do Grupo B, no pós-operatório imediato, em incidência craniocaudal em A, e lateral em B

Tabela 35 - Animal B2: Hemograma - 30 dias de pós-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	4,6	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	12,4	12 a 18	g/dL
Hematócrito	37,1	37 a 55	%
Proteínas Totais	5,2	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	15.100	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	151	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	3.171	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	11.778	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	288.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 36 - Animal B2: Exames bioquímicos - 30 dias de pós-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,8	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	13	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	33	5 a 85	U/L
AST	36	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 42 - Animal B2: Radiografia após cicatrização, 45 dias após a cirurgia.

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 2 do Grupo B, sem a visibilização da linha de fratura, sendo A em incidência lateral, e B em incidência craniocaudal

Tabela 37 - Animal B2: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom

	30 dias	60 dias	90 dias
Animal 2 – Grupo B	III	III	III

Fonte: DORA (2014)

Este paciente apresentava uma fratura médio-distal, que dificultou o uso do implante determinado no projeto, resultando em moderado desalinhamento e calo ósseo exuberante no pós-operatório; apesar disso, o animal teve boa recuperação.

Grupo Tratamento (B) - Animal 3

Figura 43 - Animal B3: durante o primeiro atendimento

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 3 do Grupo B durante o primeiro atendimento, com fratura de rádio e ulna distal

Figura 44 - Animal B3: radiografia pré-operatória

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia 7 dias após a fratura. Em A observamos a fratura em incidência craniocaudal; em B observamos a mesma imagem em incidência oblíqua

Tabela 38 - Animal B3: Hemograma – Período pré-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	8,1	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	14,2	12 a 18	g/dL
Hematócrito	50,5	37 a 55	%
Proteínas Totais	6,7	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	15.100	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	700	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	1.400	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	13.000	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	628.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 39 - Animal B3: Exames bioquímicos – Período pré-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	1,2	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	35	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	20	5 a 85	U/L
AST	35	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 45. Animal B3: Trans-operatório.

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 3 do Grupo B durante cirurgia ortopédica, com a colocação de placa ortopédica

Figura 46 - Animal B3: Trans-operatório – fluoroscopia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Fluoroscopia trans-operatória do animal 3 do Grupo B, em posicionamento mediolateral

Tabela 40 - Animal B3: Hemograma - 30 dias de pós-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	6,4	5,5 a 8,5	$\times 10^9/L$
Hemoglobina	14	12 a 18	g/dL
Hematócrito	40	37 a 55	%
Proteínas Totais	5,9	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	16.300	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	200	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	2.500	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	13.600	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	345.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 41 - Animal B3: Exames bioquímicos - 30 dias de pós-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,6	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	13	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	40	5 a 85	U/L
AST	32	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 47 - Animal B3: Radiografia após cicatrização, 90 dias após a cirurgia.

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 3 do Grupo B, após consolidação óssea. Em A, incidência craniocaudal; em B, incidência médio-lateral com ausência de linha de fratura

Tabela 42 - Animal B3: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom

	30 dias	60 dias	90 dias
Animal 3 – Grupo B	II	III	III

Este paciente foi adotado de rua e, após quinze dias de pós-operatório, houve soltura dos implantes; foi, então, realizada nova cirurgia com colocação de uma nova placa. A recuperação foi satisfatória, sem que o animal apresentasse claudicação. Após total recuperação, com 180 dias, a placa foi retirada, já que o animal apresentou fístula e provável infecção. Não houve mais nenhuma intercorrência após a retirada da placa.

Grupo Tratamento (B) - Animal 4

Figura 48. Animal B4: radiografia pré-operatória.

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia simples no período pré-operatório. Em A, linha de fratura evidenciada, em incidência craniocaudal; em B, incidência lateral

Tabela 43 - Animal B4: Hemograma – Período pré-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	5,7	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	13,2	12 a 18	g/dL
Hematócrito	41	37 a 55	%
Proteínas Totais	6,7	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	7.500	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	138	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	3.670	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	3.692	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	289.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Tabela 44 - Animal B4: Exames bioquímicos – Período pré-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,7	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	14	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	26	5 a 85	U/L
AST	20	5 a 80	U/L

Figura 49 - Animal B4: Trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 4 do Grupo B durante cirurgia ortopédica, com a colocação de placa

Figura 50 - Animal B4: Trans-operatório – fluoroscopia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Fluoroscopia trans-operatória do animal 4 do Grupo B

Figura 51 - Animal B4: Radiografia – Pós-operatório imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 4 do Grupo B – radiografia no pós-operatório imediato

Figura 52 - Animal B4: Aplicação de células-tronco 15 dias após cirurgia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 4 do Grupo B: aplicação de célula-tronco no retorno de 15 dias após cirurgia (feita com auxílio do arco cirúrgico)

Tabela 45 - Animal B4: Hemograma - 30 dias de pós-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	5,6	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	13	12 a 18	g/dL
Hematócrito	39	37 a 55	%
Proteínas Totais	6,9	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	8.400	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	158	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	3.128	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	5.114	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	236.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 46 - Animal B4: Exames bioquímicos - 30 dias de pós-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,9	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	16	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	35	5 a 85	U/L
AST	46	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 53 - Animal B4: Radiografia após cicatrização, 75 dias após a cirurgia.

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Grupo B, animal 4. Ausência de linha de fratura no rádio. (A) incidência craniocaudal, (B) incidência lateral

Tabela 47 - Animal B4: Funcionalidade do membro, durante o pós operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom

	30 dias	60 dias	90 dias
Animal 4 – Grupo B	II	III	III

Fonte: DORA (2014)

Este animal recuperou-se bem, sem complicações ou intercorrência, com bom apoio do membro e sem claudicação.

Grupo Tratamento (B) - Animal 5

Figura 54 - Animal B5: pré-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal B5 em procedimento anestésico pré-operatório

Figura 55 - Animal B5: Radiografia pré-operatória

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia simples do paciente 5 do grupo B, sendo (A) incidência lateral; (B) incidência craniocaudal

Tabela 48 - Animal B5: Hemograma – Período pré-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	6,7	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	12,4	12 a 18	g/dL
Hematócrito	38,5	37 a 55	%
Proteínas Totais	5,4	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	6.300	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	490	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	1780	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	4.030	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	189.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 49 - Animal B5: Exames bioquímicos – Período pré-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,7	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	10	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	78	5 a 85	U/L
AST	76	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 56 - Animal B5: Trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Animal 5 do Grupo B durante cirurgia ortopédica

Figura 57 - Animal B5: Aplicação de células-tronco com auxílio de fluoroscopia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Fluoroscopia e aplicação de células-tronco do animal 5 do Grupo B. Notar a agulha da seringa adentrando o foco de fratura.

Tabela 50 - Animal B5: Hemograma - 30 dias de pós-operatório

ERITROGRAMA		Referência	Unidade
Eritrócitos	6,9	5,5 a 8,5	$\times 10^6/L$
Hemoglobina	14,2	12 a 18	g/dL
Hematócrito	40,3	37 a 55	%
Proteínas Totais	6,1	5,1 a 7,2	g/dL
LEUCOGRAMA		Referência	Unidade
Leucócitos totais	7.800	6.000 a 17.000	$10^3/mL$
Eosinófilos	367	100 a 1.250	$10^3/mL$
Linfócitos	3.300	1.000 a 4.800	$10^3/mL$
Granulócitos	4.133	5.000 a 13.500	$10^3/mL$
Plaquetas	256.000	160.000 a 500.000	$10^3/mL$

Fonte: DORA (2014)

Tabela 51 - Animal B5: Exames bioquímicos - 30 dias de pós-operatório

Teste	Resultado	Referência	Unidade
Creatinina	0,5	0,5 a 1,5	mg/dL
Uréia	38	9,2 a 64,5	mg/dL
ALT	67	5 a 85	U/L
AST	54	5 a 80	U/L

Fonte: DORA (2014)

Figura 58 - Animal B5: após recuperação do quadro. Responsável abandonou o tratamento antes de finalizar o protocolo

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Paciente 5 do Grupo B após cicatrização óssea, com bom apoio do membro

Tabela 52 - Animal B5: Funcionalidade do membro, durante o pós-operatório. Grau I: impotência funcional; Grau II: regular; Grau III: bom

	30 dias	60 dias	90 dias
Animal 5 – Grupo B	II	---	---

Fonte: DORA (2014)

Esta responsável abandonou o tratamento antes da conclusão; na ocasião, paciente apresentava boa recuperação, porém com claudicação intermitente.

6.2 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS TRATADOS

Visando uma melhor compreensão das análises dos grupos estudados, compilamos os dados resultantes da cicatrização e funcionalidade dos membros dos cães na tabela abaixo

Tabela 53 - Comparação dos resultados entre os grupos A e B

Animal	Ausência da linha de fratura no rádio em dias pela radiografia	Funcionalidade do membro (Grau III) em dias
A1	45	90
A2	45	30
A3	90	30
A4	90	30
A5	75	30
B1	---	---
B2	45	30
B3	90	60
B4	75	60
B5	---	---
Média do Grupo A	69	42
Média do Grupo B	70	50

Fonte: DORA (2014)

O presente estudo demonstrou que a utilização da aplicação de células-tronco mesenquimais não alterou a evolução da cicatrização óssea, comparando-se o grupo controle com o grupo experimental.

Os resultados dos exames complementares de sangue estiveram dentro dos padrões de normalidade em todo o processo, tanto para os animais do grupo A como B. Sendo assim, pudemos observar que as células – tronco aplicadas, não apresentaram efeitos adversos.

6.3 ANIMAIS - COELHOS

6.3.1 Grupo controle

Grupo A – Realização de falha óssea e osteossíntese com placa ortopédica

Figura 59 - Período trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Coelho do Grupo A durante cirurgia ortopédica. Verificar a colocação da placa ortopédica e adequada estabilização dos fragmentos

Figura 60 - Fluoroscopia no período pós-operatório imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Fluoroscopia pós-operatória imediata. Vista craniocaudal oblíqua

Figura 61 - Pós-operatório: 30 dias após a cirurgia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia simples 30 dias após cirurgia ortopédica. Em A observamos a incidência craniocaudal, em B incidência lateral

Figura 62 - Radiografia 60 dias após cirurgia

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia 60 dias após a cirurgia – Grupo A. Em A, incidência médio-lateral, e em B a mesma incidência, com a indicação da linha de fratura e reação cicatricial.

6.3.2 Grupo Tratamento

Grupo B – Cirurgia ortopédica associada à aplicação de esponja

Figura 63 - Período trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Trans-operatório com redução da fratura e utilização de esponja de colágeno no foco da fratura.

Figura 64 - Radiografia pós-operatória imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia pós-operatória imediata do Grupo B. Vista oblíqua da placa ortopédica

Figura 65 - Radiografia simples: 30 dias de pós-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia 30 dias após cirurgia. Vista lateral da placa ortopédica

Figura 66 - 60 dias de pós-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia simples, 60 dias após cirurgia. (A) incidência craniocaudal; (B) incidência lateral. Verificar presença de falha óssea e reação cicatricial local

Grupo C – cirurgia ortopédica associada à aplicação de esponja com células-tronco

Figura 67 - Trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: (A) Cirurgia do coelho do Grupo C, com colocação de placa ortopédica; (B) Aplicação da esponja associada a células-tronco na falha óssea; (C) Apresentação das esponjas associadas às células-tronco; (D) Foto por microscopia de varredura da esponja com as células-tronco (indicadas na seta)

Figura 68 - Pós-operatório imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia pós-operatória imediata do coelho 1 do Grupo C, sendo A a incidência craniocaudal, e B lateral

Figura 69 - Radiografia 30 dias de pós-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia 30 dias após cirurgia. Vista lateral em A, com observação de neoformação de tecido ósseo no foco da falha óssea; B incidência craniocaudal.

Figura 70 - 60 dias de pós-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia 60 dias após cirurgia. Vista craniocaudal em A, com observação de neoformação de tecido ósseo no foco da falha óssea; B incidência lateral

Grupo D – cirurgia ortopédica associada à aplicação de células-tronco

Figura 71 - Trans-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Cirurgia do coelho do Grupo C, com aplicação de células-tronco em conjunto com uso de placa ortopédica

Figura 72 - Pós-operatório imediato

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia pós-operatória imediata. Verificar a falha óssea produzida no rádio, em vista lateral

Figura 73 - 30 dias de pós-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia 30 dias após cirurgia. Em A, incidência craniocaudal; em B, incidência lateral – verificar a presença de reação cicatricial

Figura 74 - 60 dias de pós-operatório

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Radiografia 60 dias após cirurgia. Verificar a presença de reação cicatricial

Figura 75 - Análise comparativa dos resultados radiográficos encontrados nos diferentes grupos tratados

Período		15 dias	30 dias	60 dias
Grupos				
Grupo A	Coelho 1	A	---	---
	Coelho 2	A	A	---
	Coelho 3	A	A	A
Grupo B	Coelho 1	A	---	---
	Coelho 2	A	DP	---
	Coelho 3	A	DP	DP
Grupo C	Coelho 1	A	---	---
	Coelho 2	A	DF	---
	Coelho 3	A	DF	DF
Grupo D	Coelho 1	A	---	---
	Coelho 2	A	DF	---
	Coelho 3	A	DF	DF

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Grupo A: Osteossíntese; Grupo B: osteossíntese e esponja; Grupo C: osteossíntese e esponja com células-tronco; Grupo D: osteossíntese e aplicação de células-tronco. Siglas: A = ausência de proliferação óssea; DP = discreta proliferação óssea; DF = proliferação óssea difusa

6.3.3 Histologia dos coelhos

Adicionalmente, foi realizada a análise histológica das regiões do membro dos animais onde foi realizada a falha óssea para que estes dados fossem comparados com as análises radiográficas, conforme descrito nas imagens a seguir.

Figura 76 - Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo A com 30 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Observa-se, em A, coloração de Stevenel's Blue. Observar osteotomia de rádio (estrela branca), condrócitos (seta amarela) e formação de tecido mineralizado. Em B, observar falha óssea (círculo vermelho).

Figura 77 - histológica do foco de fratura do coelho do grupo A com 60 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Observa-se, em A, osteócitos e lamelas ósseas indicando formação de tecido mineralizado (seta amarela). Em B, falha óssea (círculo vermelho).

Figura 78 - Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo B com 30 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Em a, observar falha óssea do rádio (estrela branca), osteoblastos em atividade formando matriz óssea (seta amarela). Em B, Observar local da falha óssea.

Figura 79 - Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo B com 60 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Em A, observa-se região da falha óssea (seta amarela), onde podemos observar osteócitos e lamelas ósseas indicando tecido mineralizado formado, início do processo de ossificação. Em B observar falha óssea com processo de ossificação (círculo vermelho, seta amarela).

Figura 80 - Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo C com 30 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Observa-se, em A, local onde foi realizada a falha óssea (seta amarela) com osteoblastos em atividade formando a matriz óssea. Em B, observar a falha óssea com processo de ossificação.

Figura 81 - Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo C com 60 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Observa-se, em A, formação de tecido mineralizado, osteócitos em atividade, formando matriz óssea (seta amarela).

Figura 82 - Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo D com 30 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Observa-se, em A áreas de ossificação (seta amarela). Em B, observar falha óssea (círculo vermelho) indicando processo de ossificação.

Figura 83 - Lâmina histológica do foco de fratura do coelho do grupo D com 60 dias de pós-operatório, e radiografia da mesma data

Fonte: DORA (2014)

Legenda: Observa-se, em A, a histologia do tecido ósseo em consolidação com aumento de 20x e, em B, o local de retirada do material para o corte histológico de referência. O círculo em vermelho indica, exatamente, o local de coleta

6.3.4 Análise comparativa entre os grupos tratados

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais dos dois grupos foram acompanhados em avaliações temporais a cada 15 dias por 120 dias, foram realizados exames radiográficos, avaliação da funcionalidade do membro e exames de sangue para avaliar possíveis alterações relacionadas às aplicações das células-

tronco. Adotamos como medida padrão para avaliação da eficácia do tratamento a ausência da linha de fratura no rádio.

Com base nos dados obtidos, não foram observadas diferenças significativas nos tempos de consolidação óssea (ausência de linha de fratura) entre o grupo controle e o grupo tratado, observando consolidação a partir de 45 dias de tratamento. Também não houve diferença significativa quanto ao grau de funcionalidade do membro entre os grupos estudados.

Nenhuma reação inflamatória nos tecidos envolvidos e adjacentes foi observada no período pós injeção nem alteração significantes nos exames de sangue realizados no grupo dos cães assim como no grupo dos coelhos.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram acompanhados em avaliações temporais 15,30 e 60 dias, foram realizados raio x, exames de sangue e posteriormente histologia do osso rádio e ulna na porção médio distal, no local da falha óssea.

Pelos exames radiográficos, exames de sangue e histologia podemos afirmar que o grupo C dos coelhos (esponja de colágeno com célula-tronco), apresentou os melhores resultados entre todos os grupos, em relação ao padrão de mineralização do tecido ósseo, que se apresentou mais difuso e consistente.

7 DISCUSSÃO

Observam-se rotineiramente na ortopedia veterinária de pequenos animais diversos tipos de fraturas de rádio e ulna, sendo estes considerados traumatismos comuns (LAPPIN, 1983; BELLAH, 1987; EGGER, 1993; TURNER, 1995). Porém, as fraturas em porções distais de rádio e ulna, principalmente em cães de raças toy, apresentam alta taxa de não união-óssea, principalmente devido à baixa vascularização local (VAUGHAN, 1995).

Nossos resultados corroboram com os de Zamprogno (2007), onde as células-tronco de medula óssea mostraram-se potenciais ferramentas para terapia celular, observando-se consolidação da fratura em cães em até três meses após a injeção de células, apresentando resultados satisfatórios para uma estimulação osteogênica em cães com histórico de fraturas de não união com cirurgias anteriores mal sucedidas.

Oliveira et al. (2010), utilizando células-tronco mononucleares autólogas em esponja de colágeno, realizou fraturas experimentais em tíbias de cães e observou 100% de consolidação com 45 dias de tratamento. Brasil (2010), realizou osteossínteses em fraturas distais de rádio e ulna em 15 cães de pequeno porte utilizando placas de titânio semitubular com garras e observou consolidação óssea aos 30, 60 e 90 dias nos diferentes cães tratados da mesma forma.

No que diz respeito aos coelhos, o carreador escolhido para este estudo foi a esponja de colágeno que, mesmo não apresentando as características de um scaffold ideal (POTIER; PETITE, 2005), mostrou-se maleável, biocompatível, poroso e reabsorvível. Com este material foi possível manter as células no local desejado por mais tempo, uma vez que o período de absorção deste material é em torno de 14 dias. Pode-se considerar desta forma, que este foi um material apropriado para o objetivo esperado, uma vez que observamos reorganização óssea nos tratamentos onde este foi empregado.

Vários estudos com animais publicados, com uso de células-tronco para reparos de não uniões tem se concentrado em modelos de defeitos críticos. Células-tronco foram combinadas com diferentes carreadores a fim de induzir o reparo ósseo in vivo. Trabalhos com ratos com defeitos em segmentos de fêmur foram tratados com células derivadas da medula óssea aderidas a cilindros de cerâmica e

implantados no defeito ósseo. Após 8 semanas, os implantes mostraram-se mais preenchidos por osso do que os segmentos dos animais que receberam somente células sem um carreador (TSENG; LEE; REDDI, 2008).

8 CONCLUSÕES

Células-tronco de medula óssea quando associadas ao uso de implantes metálicos podem auxiliar no processo de consolidação óssea, além de não ser uma técnica traumática ou invasiva.

Com base na literatura e em nossos resultados, podemos observar que o tempo de consolidação, ausência de linha de fratura, tanto em animais tratados convencionalmente, somente com a cirurgia, tanto quanto animais submetidos a uma terapia auxiliar, como a terapia com células-tronco, apresentam cicatrização óssea em torno de 45 dias.

No grupo dos coelhos, com base nos resultados obtidos, podemos afirmar que o uso de *scaffold* associado às células-tronco foi um procedimento com maior eficácia em relação ao reparo ósseo, em comparação aos demais grupos.

REFERÊNCIAS

- AZIZI, S. A.; STOKES, D.; PROCKOP, D.J. Survival, migration and engraftment of bone marrow stromal cells into the striatum of the adult rats. **Experimental Neurology**, v. 153, n. 2, p. 374-375, 1998.
- BARROS, S.V.S.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.; GALVÃO, S.R.; FILHO, A.M.; OLIVEIRA, D.R. Auto - enxerto percutaneo de medula óssea II. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 627-632, 2001.
- BELLAH, R. J. Use of a distal hook plate for treatment of a distal radial fracture in a dog. **Veterinary Surgery**, v. 16, n. 4, p. 278-282, 1987.
- BOSSOLASCO, P.; MONTEMURROT, T.; COVA, L.; ZANGROSI, S.; CALZAROSSA, C.; BUIAIOTIS, S.; SOLIGO, D.; BOSARI, S.; SILANI, V.; DELILIER, G.L.; REBULLA, P.; LAZZARI, L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. **Cell Research**, v. 16, p. 329-336, 2006.
- BRASIL, F. B. S. Utilização de placa de titânio semitubular com garras para estabilização das fraturas de rádio e ulna de cães miniaturas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 376-383, 2010.
- BRUDER, S. P.; KURTH, A. A.; SHEA, M.; HAYES, W. C.; JAISWAL, N.; KADIYALA, S. Bone Regeneration by Implantation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 16, n. 2, p. 155-162, 1998.
- CHEN, Y. J.; WURTZ, T.; WANG, C. J.; KUO, Y. R.; YANG, K. D.; HUANG, H. C.; WANG, F. S. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF- β 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, p. 526-534, 2003.
- CROVACE, A.; FAVIA, A.; LACITIGNOLA, L.; DI COMITE, M. S.; STAFFIERI, F.; FRANCIOSO, E. Use of autologous bone marrow mononuclear cells and cultured bone marrow stromal cells in dogs with orthopaedic lesions. **Veterinary Research Communications**, v. 32, p. 39-44, 2008. Supplement, 1.
- DENNY, H. R. Pectoral limb fractures. In: WHITTICK, W. G. **Canine orthopedics**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. p. 373-383.
- DJOUAD, F.; PLENCE, P.; BONY, C.; TROPEL, P.; APPARAILLY, F.; SANY, J.; NOEL, D.; JORGENSEN, C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. **Blood**, v.102, n.10, p. 3837-44, 2003.
- EGGER, E. L. Fractures of the radius and ulna. In: SLATTER, D. H. **Textbook of small animal surgery**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1993. v. 2, p. 1737-1757.

FERRIGNO, C. R. A.; SCHMAEDECKE, A.; PATANÉ, C., BACCARIN, D. C. B.; SILVEIRA, L. M. G. Estudo crítico do tratamento de 196 casos de fratura diafisária de rádio e ulna em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 8, p. 371-374, 2008.

FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; JOHNSON, A. L.; SCHULZ, K. S.; SEIM, H. B.; WILLARD, M. D. **Cirurgia de Pequenos Animais**. (3ªEd.) Brasil: Mosby.

GRANERO-MOLTO, F.; WEIS, J. A.; MIGA, M. I.; LANDIS, B.; MYERS, T. J.; O'REAR, L.; LONGOBARDI, L.; JANSEN, E. D.; MORTLOCK, D. P.; SPAGNOLI, A. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. **Stem Cells**, v. 27, n. 8, p. 1887-98, 2009.

HEINO, T. J.; HENTUNEN, T. A. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 3, p. 131–145, 2008.

HUNT, J.M.; AITKIN, M.L.; DENNY, H.R.; GIBBS, C. The complications of diaphyseal fractures in dogs: A review of 100 cases. **Journal of Small Animal Practice**, v. 21, p. 103-119, 1980.

JUNG, D. I.; HA, J.; KANG, B. T.; KIM, J. W.; QUAN, F. S.; LEE, J. H.; WOO, E. J.; PARK, H. M. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 285, n. 1-2, p. 67-77, 2009.

LA VELLE, D.G. **Delayed union and non union of fracture**. In: Canale, ST ed. Campbell's Operative Orthopaedics 9th ed St. Louis, MO: Mosby 1998: 2579-2629.

LAPPIN, M. R.; ARON, D. N.; HERRON, H. L. Fractures of the radius and ulna in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 19, p. 643-650, 1983.

MIMEAUT, M.; BATIA, S. K. Recent progresso tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 4, n. 1, p. 27-49, 2008.

MUIR, P. Distal antebrachial fractures in toy-breed dogs. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 2, p. 137-145, 1997.

OLIVEIRA, G. K.; RAISER, A. G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F. Z.; MARTINS, D. B., DEZENGRINE, R.; SANTOS JÚNIOR, E. B.; RAPPETI, J.; TRINDADE, L. B.; TOGNOLI, G. K.; PIPPI, N. L.; SAUSEN, L. Autologue mononuclear stem cells and morphogenetic bone protein in experimentally induced tibial defect healing in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 72-79, 2010.

POTIER, E.; PETITE, H. Utilisation thérapeutique des cellules souches en orthopédie. **Pathologie Biologie**, v. 53, p.142-148, 2005.

PROBST, C. W. Stabilization of fractures of the radius and ulna. In: BOJRAB, M. J. **Current techniques in small animal surgery**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. p. 783-793.

PULEO, D. A. Biotheurapeutics in orthopaedics medicine: accelerating the healing process. **Biodrugs**, v. 17, p. 301-314, 2003.

RUDD, R. G.; WHITEHAIR, J. G. Fractures of the radio and ulna. **Veterinary Clinics of the North America**: small animal practice, v. 22, n. 1, p. 135-148, 1992.

SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M. L.; QUEIRÔZ, G. F.; TATARUNAS, A. C.; ZERWES, M. B. C.; MASTROCINQUE, S.; FERRIGNO, C. R. A. Surgical treatment of delayed union and nonunion fractures in dogs: literature review. **Revista de Educação Continuada**, v. 6, n. 1/3, p. 74-82, 2003.

SEMIGLIA, G.; FILOMENO, A.; ZUNINO, J.; GORDON-FIRING, R.; YANESELLI, K.; MAISONNAVE, J. Use of autologous mesenchymal bone marrow derived cells on a canine non-union femoral fracture (preliminar results). In: ANNUAL NORTH AMERICAN VETERINARY REGENERATIVE MEDICINE ASSOCIATION CONFERENCE, 2., 2011. Kentucky, USA. [**Proceedings...** S.l: s.n, 2011].

STOCUM, D. L. Stem cells in regenerative biology and medicine. **Wound Repair Regeneration**, v. 9, p. 429-442, 2001.

STRAUER, B. E.; SCHANNWELL, C. M.; BREHM, M. Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. **Minerva Cardioangiologica**, v. 57, n. 2, p. 249-267, 2009.

TSENG, S. S.; LEE, M. A.; REDDI, A. H. Nonunions and the potential of stem cells in fracture-healing. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 90, p. 92-98, 2008. Supplement, 1.

TURNER, M.T. Fractures of the bone of the front limb. In: OLMSTEAD, M. L. **Small animal orthopedics**. St.Louis: Mosby, 1995. p. 205-208.

VAUGHAN, L. C. A clinical study of nonunion fractures in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 5, n. 8, p. 173-177, 1984.

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

WELCH, J. A.; BOUDRIEAU, R. J.; DEJARDIN, L. M.; SPODNICK, G. J. The intraosseous blood supply of the canine radius: implications for healing of distal fractures in small dogs. **Veterinary Surgery**, v. 26, n. 1, p. 57-61, 1997.

ZAMPROGNO, H. Skeletal stem cells for the treatment of nonunion fractures in dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 289-290, 2007. Supplement, 2.

ANEXO**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

Eu, _____, RG: _____, proprietário do animal _____, da espécie canina, raça _____, concordo que o meu animal participe do estudo. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Assinatura: _____

São Paulo, _____ de _____ de _____.