

DANILO ROBERTO CUSTÓDIO MARQUES

Interferência do decanoato de nandrolona associado com células tronco na consolidação óssea do defeito resultante da osteotomia para avanço da tuberosidade tibial em cães

São Paulo

2020

DANILO ROBERTO CUSTÓDIO MARQUES

Interferência do decanoato de nandrolona associado com células tronco na consolidação óssea do defeito resultante da osteotomia para avanço da tuberosidade tibial em cães

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

Departamento:

Cirurgia

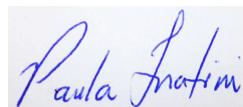
Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Paula Fratini

De acordo:



Orientador

São Paulo
2020

Obs: A versão original encontra-se 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 Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4013 FMVZ	<p>Marques, Danilo Roberto Custódio Interferência do decanoato de nandrolona associado com células tronco na consolidação óssea do defeito resultante da osteotomia para avanço da tuberosidade tibial em cães / Danilo Roberto Custódio Marques. – 2020. 82 f. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientadora: Profa. Dra. Paula Fratini.</p> <p>1. Anabolizante. 2. Consolidação óssea. 3. Reparo ósseo. 4. Ortopedia. 5. Terapia celular. I. Título.</p>
-----------------	---

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "INTERFERÊNCIA DO DECANATO DE NANDROLONA ASSOCIADO COM CÉLULAS TRONCO NA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA DO DEFEITO RESULTANTE DA OSTEOTOMIA PARA AVANÇO DA TUBEROSIDADE TIBIAL EM CÃES", protocolada sob o CEUA nº 7250220817 (ID 905947), sob a responsabilidade de **Paula Fratini** e equipe; Danilo Roberto Custódio Marques - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/12/2018.

We certify that the proposal "Effects of Nandrolone Decanoate or stem cell on time to Consolidation of Bone defects Resulting from Osteotomy for Tibial Tuberosity Advancement", utilizing 24 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7250220817 (ID 905947), under the responsibility of **Paula Fratini** and team; Danilo Roberto Custódio Marques - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/14/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2017** a **12/2020** Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **2 a 7 anos** N: **24**

Linhagem: **Animais de raça e sem raça definida** Peso: **20 a 35 kg**

Local do experimento: Hospital Veterinário Público da Anclivepa São Paulo

São Paulo, 13 de agosto de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

A minha filha Filha Maria Luisa por ser a grande força de sempre seguir lutando pelos objetivos e evoluindo. Sempre rindo. Papai te ama.

A minha pequena Rafaela. Quando qualifiquei você estava na barriga da mamãe, mas estava presente e me mandando energia. Papai te ama muito filha.

A minha esposa Ana Claudia pela compreensão, ajuda, carinho e amor em todos os momentos.

A minha mãe Neuza, falar o que de ti, com a palavra Guerreira já te resumo. Gratidão eterna. Você me mostrou como podemos ser cada vez mais fortes. Minha luta é muito menor que a luta que você passa! Juntos somos mais fortes mãe.

A minha família por sempre estar do meu lado e sempre me apoiando.

A profa. Paula Fratini, por tudo que fez por mim, aceitando me orientar, sempre estando presente, me ajudando. Obrigado pela dedicação, carinho, paciência e disponibilidade em poder lutar por mais um sonho. Eternamente grato. Um pessoa com coração gigante.

Ao meu prof. Fernando Ibañez pela ajuda, parceria e amizade.

A todos do Hospital Veterinário da Anclivepa, pela ajuda com as cirurgias, controle radiográficos e a parceria de sempre.

A empresa Focus Ortopedia pela ajuda com o penetrometro e os implantes utilizados nas cirurgias. Eternamente grato pela parceria, sem vocês teria sido muito mais difícil.

A Deus por ter me dado força, nunca ter deixado de lutar e correr atrás dos meus sonhos.

A todos os amigos da USP pela ajuda, risadas, conversas. Em especial ao Gustavo de Sá Schiavo Matias que sempre me ajudou e me acolheu como um irmão. Muito obrigado meu amigo.

A todos os professores do programa, pela paciência e sempre com vontade de ensinar.

Aos professores Rodrigo Barreto, Renata Avancini Fernandes e Ana Claudia Oliveira Carreira, que sempre tiveram paciência comigo e me ajudaram a me tornar uma pessoa e profissional melhor.

RESUMO

MARQUES, D. R. C. **Interferência do decanoato de nandrolona associado com células tronco na consolidação óssea do defeito resultante da osteotomia para avanço da tuberosidade tibial em cães** [Interference of the nandrolona decanoate associated with stem cells in bone consolidation of osteotomy defect for advanced tibial tuberosity in dogs]. 82f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Muitos estudos vem sendo realizados para acelerar o processo de consolidação óssea para diminuir o tempo de tratamento, custos e o retorno precoce do membro. As células tronco são células com capacidade de proliferação, autorrenovação, produção de diferentes linhagens celulares e regeneração de tecidos. As células tronco resultam em diferenciação e proliferação de osteoclastos e condrócitos, levando a diminuição no tempo de consolidação óssea. O decanoato de nandrolona estimula a proliferação dos osteoblastos, diminuição dos osteoclastos e estimulação do hormônio de crescimento levando a diminuição no tempo de consolidação óssea. O avanço da tuberosidade tibial permite a criação de uma falha homogênea, a qual é utilizada como modelo de estudo da consolidação óssea em cães. Objetivou-se comparar o tempo de consolidação do defeito gerado pelo avanço da tuberosidade tibial com o uso de células tronco associadas ou não com decanoato de nandrolona em cães com diagnóstico de ruptura do ligamento cruzado cranial. O trabalho dividiu-se em 4 grupos de seis animais cada: C (controle), CT (células tronco), CTDN (células tronco associado com decanoato de nandrolona) e DN (decanoato de nandrolona). O CTDN apresentou-se com o menor tempo de consolidação óssea. Ao comparar os tempos de consolidação entre os grupos houve diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,001$). A diferença esteve localizada entre os grupos controle (Grupo C) e decanoato de nandrolona (Grupo DN) (84 versus 63 dias, $P = 0,034$) e entre os grupos controle (Grupo C) e decanoato de nandrolona associado com aplicação de células tronco na falha óssea (Grupo CTDN). (84 versus 42, $P < 0,001$). A associação de CT e DN diminuiu o tempo de consolidação óssea em pacientes que realizaram TTA.

Palavras-chave: Anabolizante, Cães, Consolidação óssea, Reparo ósseo, Ortopedia, Terapia celular.

ABSTRACT

MARQUES, D. R. C. **Interference of the nandrolone decanoate associated with stem cells in bone consolidation of osteotomy defect for advanced tibial tuberosity in dogs** [Interferência do decanoato de nandrolona associado com células tronco na consolidação óssea do defeito resultante da osteotomia para avanço da tuberosidade tibial em cães]. 82f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

There have been many studies on bone healing trying to reduce treatment time, costs and promote early return of limb function. Stem cells have a number of characteristics that are useful for the healing process: proliferation, self-renewal, production of different cell lines and tissue regeneration. Nuclear stem cells result in osteoclast and chondrocyte differentiation and proliferation, leading to decreased bone healing time. Nandrolone decanoate stimulates osteoblast proliferation, osteoclast shrinkage and growth hormone stimulation leading to decreased bone healing time. Tibial tuberosity advancement surgery (TTA) creates a standardized bone defect which can be used as a model for bone healing in dogs. This study investigated the effect on time taken to consolidate the TTA defect of stem cell application and nandrolone decanoate treatment in dogs treated for cranial cruciate ligament rupture. Dogs were divided into 4 groups of six animals each receiving a different treatment post-surgery: C (control), CT (stem cells), CTDN (stem cells and nandrolone decanoate) and DN (nandrolone decanoate). There were statistically significant differences ($P < 0.001$) in consolidation times between the control group (Group C) and nandrolone decanoate (DN) (84 versus 63 days, $P = 0.034$) and between the control groups (Group C) and nandrolone decanoate and stem cells (CTDN) (84 versus 42, $P < 0.001$). The combination of CT and DN decreased bone healing time in dogs undergoing TTA surgery.

Keywords: Anabolic, Dogs, Orthopedics, Bone Repair, Bone Consolidation, Cell therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo Geral.....	12
3.2 Objetivos Específicos.....	12
3. HIPÓTESE	13
4. REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1 <i>Composição do tecido ósseo</i>	14
4.2 <i>Osteogênese</i>	16
4.3 <i>Consolidação óssea</i>	17
4.4 <i>TTA como modelo de consolidação óssea em cães</i>	20
4.5 <i>Decanoato de nandrolona</i>	21
4.6 <i>Células tronco de polpa dentária canina</i>	26
4.6 <i>Células tronco como estimulador da consolidação óssea</i>	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 Procedimento cirúrgico.....	35
5.2 Pós-operatório.....	37
5.3 Aplicação de decanoato de nandrolona.....	37
5.4 Aplicação de células tronco na falha óssea.....	38
5.5 Estudo radiográfico da consolidação óssea.....	40
5.6 Análise estatística.....	43
5.7 Questionário de qualidade de vida.....	44
6. RESULTADOS	48
7. DISCUSSÃO	57
8. CONCLUSÃO	62
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	63
ANEXO A	79
ANEXO B	82

1) INTRODUÇÃO

A consolidação de fraturas está relacionada a vários fatores como o tipo de fratura, grau de envolvimento dos tecidos moles, condição física do paciente, empenho e interesse do proprietário e experiência do cirurgião (JACSON, 2005; OROSZ, 2002; SIQUEIRA et al., 2001).

Atualmente o estudo de métodos que diminuem o tempo de consolidação óssea é cada vez mais evidente tanto na medicina humana como na veterinária (DANTAS et al., 2011; FOSSUM et al., 2007). O uso de esteróides anabólicos tem sido bastante estudado em seres humanos (SILVEIRA, 2013). Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são derivados sintéticos da testosterona, sendo o decanoato de nandrolona um dos principais representantes (GUYTON; HALL, 2002).

O avanço da tuberosidade tibial é um modelo para estudo de ossificação em cães, pois é uma osteotomia com forma regular, contrastando com os defeitos ósseos gerados a partir de fraturas traumáticas que, pela sua irregularidade, impossibilitam a repetição das condições de cicatrização óssea. Este modelo leva a criação de condição de assepsia cirúrgica, eliminando o papel adverso que a infecção poderia ter na consolidação óssea. (BOUDRIEAU, 2011; SILVEIRA 2013).

O controle da cicatrização óssea pelo exame radiográfico em pacientes que realizaram TTA é de fácil realização quando utilizadas as projeções médio laterais, pois não ocorre nenhuma sobreposição de estruturas mais radiopacas que poderia dificultar a constatação da progressão da radiopacidade inerente à formação de osso no local da osteotomia (SILVEIRA, 2013).

O decanoato de nandrolona atua no aumento de massa muscular, pelo aumento da síntese de proteínas, aumento de eritrócitos; produz um efeito positivo no crescimento ósseo pela estimulação da produção do hormônio de crescimento (GH); aumenta a quantidade de matriz óssea e a deposição de sais de cálcio (IBANEZ; SILVA; PONTES, 2003).

A terapia celular tem atraído atenção clínica considerável para o tratamento de várias doenças por muitas décadas. Acredita-se que as células-tronco sejam uma fonte ideal de células para a terapia de reposição celular para doenças ósseas devido às suas propriedades de auto-renovação e plasticidade, que podem reparar ou regenerar os tecidos danificados. Os tipos de células-tronco do candidato incluem células tronco

embrionárias (ES), células tronco pluripotente induzido (iPS) e células mesenquimais somáticas, tais como MSCs (TAKAHASHI et al., 2007).

As MSCs conseguem se auto-renovar e se diferenciar em tecidos específicos como ossos, tecido adiposo e cartilagem. Na osteoporose os MSCs promovem a regeneração óssea e o fortalecimento do tecido ósseo, prevenindo fraturas patológicas. As MSCs produzem tecido ósseo por dois mecanismos: diferenciação em células formadoras de tecido ósseo em um local danificado e atuando de forma paracrina, segregando certos fatores de crescimento que modificam o meio ambiente e recrutam células residentes para reparar o tecido lesionado (LEE et al., 2011; YE et al., 2014).

As MSC derivadas de tecido adiposo (AD-MSCs) são isoladas de tecidos adiposos através de uma abordagem minimamente invasiva e podem ser expandidas e diferenciadas em linhagens mesenquimais clássicas envolvidas na adipogênese, osteogênese e condrogênese (ARANA et al., 2013; STREM et al., 2005).

As AD-MSCs são mais facilmente isoladas, mais abundantes e produzem maiores rendimentos em termos de número de células em comparação com as células de medula óssea (BM-MSC) (KERN et al., 2006). No entanto, o rendimento de AD-MSCs e suas capacidades de proliferação e diferenciação variam dependendo do local de colheita de tecidos (JURGENS et al., 2008) e da idade do doador (CHOUDHERY et al., 2014).

Ratos com osteoporose SAMP6 mostraram melhora significativa em vários parâmetros ósseos trabeculares após um único transplante intratibial de AD-MSC isogênicos (MIRSAIDI et al., 2014; LEE et al., 2015; LEDESMA-MARTÍNEZ et al., 2016).

Os osteoblastos (OBs) são derivados de células do estroma medular da medula óssea (BM-MSCs), que podem se auto-renovar e diferenciar em OBs, condrócitos ou adipócitos, enquanto os osteoclastos (OCs) são derivados de monócitos (EDWARDS; MUNDY, 2011; HARADA; RODAN, 2003, LACEY et al., 2012;).

Estudos *in vivo* e *in vitro* sobre testosterona e outros hormônios do grupo dos andrógenos aumentaram um grande interesse devido às suas influências nas células-tronco (DI MAMBRO et al., 2010; HUANG et al., 2013a; HUANG et al., 2013b).

Recentemente, surgiram dúvidas sobre a ação da testosterona em células estaminais, MSCs ou EPCs circulantes. Estudos revelaram que o número dessas células aumenta significativamente de maneira dependente de testosterona por modulação de

óxido nítrico (NO) sintetase em um receptor de androgênio RM (SWERDLOW et al., 2005; DI MAMBRO et al., 2010; PLACENCIO et al., 2010; WEST et al., 2012).

Além disso, a administração de testosterona em camundongos castrados restaura a trombocitopenia ocorrida após a castração (LIAO et al.; 2013).

Estudo indica que a estimulação *in vitro* com testosterona de células adultas (MSCs) e células progenitoras (EPCs) preserva a estrutura celular e aumenta significativamente a capacidade adesiva e proliferativa das células-tronco. Não obstante, estudos adicionais são necessários para determinar os mecanismos envolvidos no efeito da testosterona sobre MSCs e EPCs, sobrevivência e mobilização das células (SWERDLOW et al., 2005; COROTCHI et al., 2016).

2) OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste estudo foi comparar o tempo de consolidação óssea do defeito resultante de cirurgias de avanço da tuberosidade da tíbia para correção da instabilidade por ruptura do ligamento cruzado cranial em cães com uso de decanoato de nandrolona por via intramuscular, associado ou não às células tronco com a cirurgia convencional, sem adição de nenhum outro tratamento. Utilização de questionário para acompanhamento dos animais estudados.

2.1 Objetivos específicos

- 1.1.** Avaliar se o uso de células tronco interfere no tempo de consolidação óssea do defeito resultante da osteotomia para avanço da tuberosidade tibial em cães.
- 1.2.** Avaliar se o uso de células tronco associado ao decanoato de nandrolona interfere no tempo de consolidação do defeito resultante da osteotomia para avanço da tuberosidade tibial em cães.
- 1.3.** Avaliar se o decanoato de nandrolona potencializa a ação das células tronco.

3) HIPÓTESE

a) Células tronco reduzem o tempo de consolidação do defeito resultante da cirurgia para avanço da tuberosidade tibial para correção da instabilidade resultante da ruptura do ligamento cruzado em cães.

b) Decanoato de nandrolona associado à células tronco reduzem o tempo de consolidação do defeito resultante da cirurgia para avanço da tuberosidade tibial e correção da instabilidade resultante da ruptura do ligamento cruzado em cães.

c) Mostrar a sinergia ou não da associação de células tronco com decanoato de nandrolona em vivo.

4) REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Composição do tecido ósseo

O tecido ósseo constitui o esqueleto, sendo o suporte para os tecidos moles e proteção a órgãos vitais, como o cérebro e medula espinhal; é responsável pela produção de células sanguíneas; proporciona apoio e suporte aos tecidos musculares, transformando e ampliando suas contrações em movimentos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; ZAMARIAN, 2014).

Os ossos também funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os, de maneira controlada, para manter a homeostase (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

O tecido ósseo é constituído por células e matriz óssea, tecido conjuntivo especializado e material extracelular mineralizada (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Esse tecido apresenta a capacidade de regeneração devido a presença de elementos fundamentais como, células osteocompetentes, mediadores biológicos (fatores de crescimento), matriz e suporte estrutural (MOTTA, 2009).

As células constituintes do tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras. Os osteoblastos originam-se a partir das células osteoprogenitoras e são responsáveis pela síntese e secreção dos constituintes orgânicos da matriz óssea, sendo capazes também de armazenar fosfato de cálcio que participa da mineralização da matriz óssea. Quando aprisionados na matriz óssea recém-sintetizada, os osteoblastos passam a ser chamados de osteócitos, ocupando cavidades na matriz óssea, as lacunas. Das lacunas partem canaliculos que contêm prolongamentos celulares que se dirigem para outras lacunas. Através dessa rede, ocorre comunicação entre osteoblasto e osteócito. Além disso, os osteoblastos produzem fatores de crescimento sob influência do hormônio do crescimento (GH) nos focos de remodelagem e são imprescindíveis para a manutenção da matriz óssea, uma vez que detectam alterações físicas e químicas deste tecido, e sua morte desencadeia a reabsorção da matriz (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008; MOTTA, 2009, ZAMARIAN, 2014).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas (de seis a 50 núcleos), móveis com muitas projeções citoplasmáticas. Sendo responsáveis pela reabsorção e remodelação do tecido ósseo (BARRÉRE *et al.*, 2006; GARTNER e HIATT, 2007; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; MOTTA, 2009).

O componente do tecido orgânico, constituído principalmente de colágeno tipo I (85%), com pequenas quantidades de colágeno tipo III e V (5%), são produzidos pelos osteoblastos. Os outros 10% da matriz são constituídos por proteínas não colágenas, como osteopontina, sialoproteínas óssea, osteonectina, osteocalcina, fatores de crescimento e citocinas (TZAPHLIDOU, 2005). A porção inorgânica da matriz é composta basicamente de íons fosfato e cálcio organizados em cristais de hidroxiapatita (DALLE CARBONARE *et al.*, 2005; TZAPHLIDOU, 2005). As lacunas e os canalículos são formados após a deposição da matriz óssea ao redor do corpo da célula e de seus prolongamentos (MOTTA, 2009).

Macroscopicamente o osso pode ser classificado como esponjoso, que apresenta arranjo trabecular delimitando pequenas cavidades preenchidas por medula óssea ou osso compacto, formado por lamelas ósseas paralelas ou concêntricas (sistema de Havers), não apresentando cavidades. Ambos apresentam a mesma constituição histológica (KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

As superfícies interna e externa dos ossos são revestidas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, constituindo assim o endóstio e perióstio, respectivamente. A camada mais superficial do perióstio é formada principalmente por fibras de colágeno e fibroblastos. As fibras de Sharpey são feixes de fibras de colágeno do perióstio que penetram no tecido ósseo e prendem firmemente o perióstio ao osso. Na sua porção mais interna, o perióstio apresenta mais células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos, desempenhando importante papel no crescimento do tecido ósseo e em reparação de fraturas. O endóstio é constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas que revestem as cavidades do osso esponjoso e canal medular. As principais funções desses tecidos são a nutrição do tecido ósseo e fornecimento de novos osteoblastos para o crescimento e a consolidação óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008)

O tecido ósseo é dinâmico, apesar da rigidez e aparente inatividade, apresentando processo combinado e constante de formação e reabsorção, chamado de remodelamento ósseo ou “*turn over*” ósseo. Esse remodelamento é determinado pela carga genética e se mostra dependente de regulação realizada por influências ambientais, endócrinas e bioquímicas. Mesmo em animais adultos, o osso é metabolicamente ativo e a manutenção da matriz é o resultado do balanço entre síntese e reabsorção óssea, reflexo das atividades antagonistas de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente (DAVIES, 2000). Esse processo é fisiológico e contínuo permitindo

que o tecido ósseo se renove continuamente, responda aos estímulos externos e sofra a reparação (KATCHUBURIAN e ARANA, 2004).

A medula óssea existe sob duas formas: medula vermelha, que produz elementos figurados do sangue e medula óssea, constituída de tecido adiposo unilocular e pequena quantidade de elemento figurados (GARTNER e HIATT, 2007).

4.2 Osteogênese

A ossificação intramembranosa (OI) e ossificação endocondral (OE) são dois processos de osteogênese. A OI é a formação de tecido ósseo a partir de uma membrana conjuntiva fibrosa, não apresentando o tecido cartilaginoso prévio. Se inicia a partir de uma membrana mesenquimal extremamente vascularizada, a qual as células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, que por sua vez iniciam a produção de matriz óssea orgânica, formando assim trabéculas de tecido ósseo. As trabéculas formadas vão se interconectando, formando assim tecido ósseo esponjoso, cujas regiões periféricas são remodeladas para originar osso compacto. A região da membrana mesenquimal que não participa do processo resulta em endóstio e perióstio (GARTNER E HIATT, 2007).

A OE constitui a formação de osso produzido por condrócitos que originam inicialmente uma matriz cartilaginosa calcificada, que será remodelada em tecido ósseo (como exemplo, ossos longos) (BOGLIOLO e BRASILEIRO-FILHO, 2006). Esse tipo de ossificação ocorre a partir de tecido cartilaginoso hialino que é utilizado como molde sobre o qual o osso é formado (ZAMARIAN, 2014).

O único tecido com capacidade de crescimento e remodelação por meio de reabsorção e neoformação é o osso. Durante o crescimento, ocorrem alterações na estrutura anatômica do osso, fortalecendo as regiões que suportam maiores tensões e estão sujeitas à sobrecarga de peso e que requerem maior resistência (MOHAN e BAYLINK, 1991; MARTINEZ e MILLIS, 2003). Alguns fatores de crescimento, citocinas e as proteínas da matriz óssea ajudam como moduladores da remodelação. Os fatores de crescimento são polipeptídeos produzidos pelo tecido ósseo ou extra-ósseos, que atuam como moduladores das funções celulares, principalmente crescimento, diferenciação e proliferação. Fator de crescimento de insulina tipo 1 (insulin-like growth factor I); II-somatomedina (IGF-I e II); fator de transformação do crescimento B (TGF-B); proteína morfogenética óssea (BMP); fator de crescimento derivado de plaquetas

(PDGF); fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são os principais fatores de crescimento atuantes. Pela remodelação, o tecido ósseo pode ainda controlar a hemostasia mineral, conjuntamente com rins e intestinos (PÉREZ-SANCHEZ, 2010).

4.3 Consolidação óssea

O reparo ósseo é um processo multifatorial e complexo, englobando uma série de fatores celulares, moleculares e hormonais e, em condições fisiológicas, tem duração de de quatro a seis semanas, mas pode durar anos (ROZEN *et al.*, 2007; SCHINDELER *et al.*, 2008).

Existem dois tipos de consolidação óssea: primária e a secundária. Na consolidação primária não há formação de calo ósseo, e as células osteogênicas e endoteliais dos capilares morrem próximas a área lesada devido à interrupção da circulação. Ocorre também a morte dos osteócitos que circundam os canais de Havers. Nos locais dos canais de Havers, onde as células estão vivas, ocorre proliferação celular, crescimento celular e neovascularização. As células osteogênicas se transformam em osteoblastos e iniciam a reconstrução dos canais de Havers (LANDE *et al.*, 2012).

O processo de consolidação secundária é complexo e pode ser dividido em três fases, sendo elas inflamatória, de reparação (proliferação) e remodelamento (VELLOSO, 2005; LANDE *et al.*, 2012). A fase inflamatória inicia logo após a fratura e perdura até a segunda e terceira semana. Nessa fase há comprometimento vascular que leva a hemorragia local e desenvolvimento de hematoma, sendo estes a marca do início dessa fase. Essa fase envolve vários fatores de inflamação como plaquetas, mastócitos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, fibronectina, osteoblasto, fatores de crescimento, células endoteliais, fibroblastos, além da liberação de citocinas pelas células inflamatórias sendo as principais inter-leucina 1 (IL-1), inter-leucina 6 (IL-6), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator transformador de crescimento B-1 (TGF-B1) (KALFAS, 2001; ROZEN *et al.*, 2007; GIANNOUDIS *et al.*, 2007; GOLDHAHN *et al.*, 2010; KOLAR *et al.*, 2010).

Estes fatores são quimiotáticos e, dessa forma, iniciam a fase de reparação, promovendo influxo de células mesenquimatosas do periósteo, endósteo e tecido muscular adjacente. Essas células posteriormente, irão se diferenciar em fibroblasto, condroblasto e osteoblasto para originar tecido fibroso, cartilaginoso e ósseo,

respectivamente. Associado a proliferação e diferenciação celular ocorre a angiogênese, que dará origem ao tecido de granulação (SILVEIRA, 2013).

Para que possa ocorrer consolidação óssea, o defeito ósseo, progressivamente, vai sendo preenchido por tecido de maior resistência mecânica. O tecido de granulação, formado em torno de três a quatro dias, inicia promovendo pequena estabilidade no foco de fratura (FOSSUM *et al.*, 2007). O tecido de granulação é marcado por intensa angiogênese e recrutamento de células mesenquimais progenitoras, resultando em tecido altamente vascularizado e com alta concentração de células indeferenciadas. As células progenitoras provem do tecido muscular, osso cortical e medular adjacentes a lesão e do periósteo (ROZEN *et al.*, 2007).

A formação desse tecido depende da ação quimiotática e mitogênica do fator de crescimento transformador beta (TGF-B) que é produzido por macrófagos e plaquetas presentes no hematoma, direcionando e estimulando células mesenquimais, osteoprogenitoras, condroblastos e osteoblastos. Além disso, o TGF- B inibe enzimas proteolíticas que poderiam destruir o tecido neoformado e regula a produção de matriz celular orgânica (KALFAS, 2001; ROZEN *et al.*, 2007).

Propõe-se que as BMPS (proteínas ósseas morfogenéticas) e TGF-B, associado a fatores PDGFs (fator de crescimento derivado de plaquetas), IGF – II (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2) e FGFs (fator de crescimento de fibroblastos), atuem no recrutamento e diferenciação celular das células primitivas. Os fatores que influenciam diretamente na angiogênese são FGFs, HIF-1 (fator induzido por hypoxia 1) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (PHILLIPS, 2005; ROZEN *et al.*, 2007; TSIRIDIS *et al.*, 2007; SCHINDELER *et al.*, 2008).

A maturação do tecido de granulação leva a formação de calo ósseo que promove maior rigidez devido à substituição das fibras de colágeno finas por fibras de colágeno cada vez mais densas, organizadas e cada vez menos elásticas. A diminuição da elasticidade do tecido leva a substituição de tecido conjuntivo fibroso por tecido cartilaginoso que, sequencialmente é substituído por osso trabecular através da ossificação endocondral (GOLDHAHN *et al.*, 2010).

Nessa fase, ocorre grande diferenciação e proliferação de células osteogênicas mediadas pelo TGF-B, e sobrepondo-se a fase inflamatória, inicia no terceiro dia e termina-se aproximadamente no sexto dia do reparo tecidual, totalizando quatro dias (ROZEN *et al.*, 2007).

A formação do calo ósseo ocorre do quarto até o décimo quarto dia após a lesão

tecidual. O tecido de granulação é origem dos tecidos cartilaginoso e ósseo pela associação dos processos de ossificação intramembranosa e endoconal. No tratamento da maior parte das fraturas a ossificação endoconal é a predominante devido à instabilidade presente dos fragmentos da fratura (TSIRIDIS *et al.*, 2007; SCHINDELER *et al.*, 2008).

Nessa fase é formado infiltrado rico em fibroplasto e células mesenquimais, já recrutadas, que se diferenciam em condroblastos capazes de sintetizar matriz cartilaginosa, isto é, colágeno tipo II e proteoglicanos, caracterizando o calo macio. Os condroblastos diferenciam-se em condrócitos maduros, levando a hipertrofia do tecido cartilaginoso, portanto, confere certa estabilidade mecânica até que o calo cartilagino seja mineralizado gradualmente (ROZEN *et al.*, 2007).

A vascularização se forma no calo cartilaginoso e promove mineralização intersticial, os condrócitos maduros sofrem apoptose e o tecido cartilaginoso é removido gradualmente pelos osteoclastos vindos do aporte vascular e substituído por matriz óssea neoformada pelos osteoblastos (KALFAS, 2001; TSIRIDIS *et al.*, 2007; SCHINDELER *et al.*, 2008). Os osteoblastos diferenciados sintetizam proteína não colágena chamada osteocalcina, que incorporada à matriz óssea, contribui para a mineralização (SARAIVA *et al.*, 2002).

A diferenciação de células tronco em células osteoprogenitoras é regulada por sinalizações celulares (parácrinas e autócrinas) no sítio local e por estímulos externos, entretanto, pode sofrer influência de hormônios sistêmicos como 1,5 dihidroxivitamina D, hormônio tireoideano, paratormônio, esteróides sexuais e hormônio do crescimento (GIANNOUDIS, 2007; KERAMARIS *et al.*, 2008). A fase de remodelamento inicia-se logo após a formação do calo duro (aproximadamente 14 dias) e pode durar meses ou anos. O processo de substituição do osso trabecular por osso medular é chamado de remodelamento harvesiano (*Haversian Remodeling*). Esse processo leva a restituição do canal medular e a substituição de todo o tecido cicatricial formado durante a consolidação óssea e, por fim, faz com que o osso tenha o mesmo aspecto do osso original (VELLOSO, 2005; ZAMARIAN, 2014).

Os grandes protagonistas no processo de remodelação são os osteoclastos por promoverem reabsorção do calo mineralizado abundante e com integração dos osteoblastos, reestruturam o tecido ósseo. O processo de remodelamento começa na borda periosteal do calo duro e com o passar do tempo evolui para a região endosteal, reestabelecendo o canal medular (ROZEN *et al.*, 2007).

4.4 TTA como modelo de estudo da consolidação óssea em cães

A ruptura do ligamento cruzado cranial (RLCC) é uma das principais causas de claudicação do membro posterior em cães. As causas são multifatoriais como sinovite linfocítica plasmocítica, trauma, elevado ângulo do platô tibial, doenças hormonais como o hipotireoidismo, idade avançada e obesidade (VASSEUS, 2007; COOK et al., 2010). As raças de grande porte são as mais acometidas, mas acomete todas as raças, idades e portes (WHITEHAIR *et al.*, 1993; DUVAL *et al.*, 1999).

Várias técnicas são descritas para a correção da instabilidade gerada pela ruptura do ligamento cruzado cranial em cães, podendo ser classificadas em: intra- capsular, extra-capsular e técnicas de correção da biomecânica (SMITH, 2000).

As osteotomias corretivas, modificam a biomecânica do movimento articular, melhorando dessa forma, a distribuição de forças e proporcionando estabilidade dinâmica à articulação. A técnica de avanço da tuberosidade da tíbia (TTA), consiste em tornar perpendicular ao platô tibial, o ligamento patelar, para que as forças de cisalhamento sejam neutralizadas por este (KIM *et al.*, 2008).

A TTA pode ser modelo ideal para estudo de ossificação em cães, pois resulta em defeito padronizado, contrastando com os resultantes de fraturas traumáticas que, pela sua irregularidade e variabilidade na quantidade de energia envolvida, impossibilitam a repetição das condições da consolidação óssea (LAFEVER *et al.*, 2007; BOUDRIEAU, 2011; SILVEIRA, 2013).

A cicatrização da falha óssea na TTA ocorre de forma secundária, com isso, mesmo utilizando enxerto ósseo não muda o tipo de cicatrização pode possibilitar a cicatrização em menor tempo e permitir a função do membro precoce (BOUDRIEAU, 2011). Outra característica permitida pela TTA é a possibilidade da repetição do defeito ósseo, algo impossível em fraturas espontâneas, isto é não permite ter um grupo homogênea que possibilite a comparação da cicatrização óssea (LAFEVER et al., 2007).

O controle da consolidação óssea pelo exame de imagem em paciente submetido a TTA é fácil pois não ocorre sobreposição de estruturas ou implantes, que poderia dificultar a interpretação radiográfica (BISGARD *et al.*, 2011; GERRERO *et al.*, 2011; LANDE *et al.*, 2012; SILVEIRA, 2013).

Silveira (2013) utilizou a avanço da tuberosidade tibial como modelo padrão para comparar o tempo de cicatrização óssea utilizando osso esponjoso ou osso

esponjoso associado à fibrina rica em plaquetas e leucócitos na falha óssea.

4.5 Decanoato de nandrolona

Os anabolizantes são capazes de alterar diversos processos fisiológicos, entre eles a formação de tecidos corpóreos. A testosterona é o hormônio masculino e tem grande importância na formação de tecido muscular (PALERMO-NETO, 2002).

Muitas das enzimas que participam da atividade dos esteróides sexuais são encontradas no tecido ósseo. Essas enzimas convertem testosterona (T) em estradiol 2 (E2); 17-B dehidrogenase (controlando a conversão da androstenediona para T e E1 [estrone] para E2); e a sulfatase, a enzima que regula a sulfatação da estroma. A enzima α -redutase transforma a testosterona em dihidrotestosterona. Nas células do periosteio não há atividade da enzima α -redutase, indicando que a testosterona pode ser um metabólico ativo nessa região. Já foi comprovado que existem receptores de andrógenos nos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (VANDERSHUEREN *et al.*, 2004).

A testosterona atua sobre o cálcio livre citosólico e o metabolismo de fosfolipídios da membrana em osteoblastos de ratos machos. Além disso, desencadeia transitório aumento no cálcio no tecido ósseo, acompanhado pela manutenção de uma fase platô (LIEBERHERR e GROSSE, 1996).

Os osteoblastos são as células ósseas que mais expressam reatividade aos andrógenos, sendo a resposta maior no osso cortical em relação ao esponjoso e no osso jovem em comparação com o osso senil (NOTELOVITZ, 2002).

Em camundongos machos foi constatado que a ação da testosterona mediada pelo receptor de andrógenos é essencial para formação periosteal óssea e contribui para manutenção do osso trabecular (VANDERPUT *et al.*, 2004).

A testosterona estimula a proliferação de osteoblastos experimentalmente, mas a exposição prolongada pode inibir a proliferação dessas células. Portanto a terapia intermitente melhora a densidade óssea em mulheres, mais do que a terapia contínua (CALLEWAERT *et al.*, 2010).

O uso de andrógenos, como a testosterona e seus análogos, aumenta a síntese de proteínas na matriz extracelular, como o colágeno tipo 1, osteocalcina e osteonectina, além de aumentar a diferenciação de osteoblastos, estimulam a mineralização óssea e regulação e produção de matriz óssea (NOTELOVITZ, 2002).

A testosterona tem efeito no fator de transformação de crescimento (TGF- β),

potente mitógeno de osteoblastos. Além disso, atua sobre o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), crescimento similar a insulina 2 (IGF II) e diminui a gênese de osteoclastos por inibição na produção de interleucina-6 (IL-6) nas células de osteoclastos do osso medular. Esse hormônio inibe o hormônio da paratireóide e interleucina-1 (IL-1) causando menor ação osteoclastica e menor reabsorção óssea. (NOTELOVITZ, 2002).

A incorporação da testosterona ao compósito de poli ácido lático-coglicólico (PLGA), policaprolactona (PCL) e fosfato de cálcio bifásico (BCP) aumentou a viabilidade e proliferação dos osteoblastos; a diferenciação dos osteoblastos; atividade da fosfatase alcalina; produção de colágeno; concentração de osteocalcina; sugerindo que a testosterona estimula a produção da matriz extracelular e influencia a maturação dos osteoblastos, *in vitro*. Esse composto *in vivo* acelerou a mineralização da matriz extracelular, apresentando nódulos de mineralização a partir de sete dias (COSTA, 2014).

Segundo Broulík e Broulíkova (2007), os andrógenos exercem efeito marcante na homeostase óssea, portanto foram observados em ratos castrados uma osteopenia no fêmur rapidamente após o procedimento de orquiectomia.

As principais vantagens do uso da testosterona são o ganho de massa muscular, aumento da síntese de proteínas, diminuição de degradação protéica, inibição dos efeitos catabólicos dos glicocorticóides, melhora recuperação muscular, aumento da taxa de transcrição gênica e estimulação da medula óssea (BACURAU *et al.*, 2001).

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são derivados sintéticos do hormônio masculino testosterona, sendo o decanoato de nandrolona (DN – Deca durabolin®) um dos principais representantes, que começou a ser comercializado em 1962 (GAO *et al.*, 2005).

Um dos esteroides anabólicos mais utilizados é o decanoato de nandrolona (Deca durabolin®) que começou a ser comercializado em 1962. Essa substância é formada pela esterificação de um grupo 17^a-hidroxil com ácido decanóico, um ácido graxo de cadeia longa. Essa droga é liberada lentamente na corrente sanguínea após administração pela via intramuscular, exercendo atividade anabólica ótima depois de seis a sete dias. Apresenta alta atividade anabólica e baixa atividade androgênica (CUNHA *et al.*, 2004; SHAHIDI, 2001).

É classificado como não-aromatizável, por causa da baixa conversão a estrogênio, diminuindo os efeitos colaterais quando como os efeitos feminilizantes (KUHN, 2002).

Os esteróides anabolizantes como o decanoato de nandrolona, são medicamentos utilizados para tratamento de estados catabólicos agudos e osteoporose em seres humanos (CUNHA et al., 2004). O decanoato de nandrolona atua no aumento de massa muscular, pelo aumento da síntese de proteínas; produz efeito no crescimento ósseo pela a síntese de hormônio do crescimento; aumenta a quantidade de matriz óssea e a deposição de cálcio, bem como aumento de hemácias (estimula a eritropoiese); leva a diminuição na produção de uréia diminuição de tecido adiposo e bloqueio da ação do cortisol (NAVARRO et al., 2002).

O decanoato de nandrolona vem apresentando bons resultados no tratamento da osteoporose, com aumento de massa óssea e melhora da qualidade de vida representada por aumento do bem-estar subjetivo. Por aumentar a massa muscular, pode atuar sobre a melhora do equilíbrio. Seus efeitos adversos mais comuns são aumento de pêlos, alterações do timbre da voz e retenção hídrica; sua ação mitogênica restringe o uso em pessoas com neoplasia (FRISOLI, 2012; LEMOS; NAKAOKA; KASHIWABARA, 2013).

Este anabolizante foi utilizado em um modelo experimental em coelhos com fraturas de tíbia na qual foi observando melhor cicatrização óssea devido aumento da atividade os osteoblastos, melhor mineralização óssea e inibição os osteoclastos (AHMAD et al., 2013). Os anabolizantes têm a capacidade de desencadear a liberação de fator de crescimento, que estimula a formação de osso nos tecidos de granulação (FRISOLI-JUNIOR, 2012).

A fosfatase alcalina e a histopatologia óssea são de grande importância para a avaliação da atividade osteoblástica para verificar estimulação e cicatrização óssea (AHMAD et al., 2013; IBANEZ; SILVA; PONTES, 2003). Em humanos os principais efeitos adversos são aumento no risco de doenças cardiovasculares, neoplasias hepáticas, infertilidade, alterações de comportamento, da próstata e função imunológica. (BAHRKE; YESALIS, 2004). O uso em crianças pode levar ao fechamento prematuro das epífises o que resultaria na diminuição do crescimento (SHAHIDI, 2001).

Como todos os anabolizantes dessa classe, seu efeito é exercido sobre vários tecidos, como músculos e ossos (KICMAN, 2008; GHIZONI et al., 2013; PIOVESAN et al., 2013).

O DN, que apresenta alta atividade anabólica e baixa atividade androgênica, é liberada lentamente na corrente sanguínea após a administração pela via intramuscular, exercendo atividade anabólica ótima depois de seis a sete dias (SHAHIDI, 2001; CUNHA *et al.*, 2004). Produz efeito anabólico predominante e baixo potencial androgênico capaz de promover hipertrofia muscular. Por ser não aromatizável, apresenta poucos efeitos indesejáveis como os feminilizantes quando usados por muito tempo ou em doses supra-fisiológicas (KUHN, 2002; CUNHA *et al.*, 2004). Infelizmente, tem sido utilizado por atletas de forma indiscriminada (DUTRA *et al.*, 2012).

O DN vem sendo estudado desde 1980 devido a possibilidade de inibir a reabsorção óssea, estimular a osteogênese e aumentar a massa óssea (DHEM *et al.*, 1980). Em estudo *in vitro* demonstrou-se a presença de receptores androgênicos em células “osteoblast-like” que estimulam a diferenciação e proliferação osteoblástica (KOUSTENI *et al.*, 2007).

O DN tem a capacidade de aumentar a densidade óssea em situações de osteopenia, sendo utilizada para tratamento de mulheres com osteoporose por promover a osteoindução em mulheres pré e pós menopausa (GENNARI, *et al.*, 1989; PASSERI *et al.*, 1993; AITHAL *et al.*, 2009; LEMOS *et al.*, 2013).

A DN já foi utilizada como profilaxia no desenvolvimento de osteopenia por desuso devido a traumas neurológicos (CARDOZO *et al.*, 2010), prevenção de alterações deletérias na musculatura esquelética em desuso (FUSATTO, 2010; PARDI, 2010) e regeneração de tecido músculo esquelético, com resultados favoráveis (TAVARES *et al.*, 2008).

Takahashi *et al.* (2004) relataram o aumento de concentrações séricas de testosterona em ratos ao utilizarem o decanoato de nandrolona. Figueiredo (2009) observou aumento de duas vezes nas concentrações de testosterona total sérica em ratos tratados com nandrolona.

O DN atua no aumento de massa muscular, no aumento da síntese de proteínas, aumento dos hematócritos, crescimento ósseo através da estimulação da produção do hormônio de crescimento (GH), aumento da quantidade de matriz óssea, deposição de cálcio no tecido ósseo, redução no índice de fraturas (TIDERMARK *et al.*, 2004; BERIASHVILI *et al.*, 2006; TENGSTRAND *et al.*, 2007). A dose utilizada em cães é de 2mg/kg/ pela via intramuscular profunda a cada 21 dias, podendo ser usado até ser observado a consolidação óssea (IBAÑEZ *et al.*, 2003). O DN é gradualmente liberado

do depósito intramuscular e hidrolisado em nandrolona (GAO *et al.*, 2005).

Os efeitos adversos mais comuns em humanos são: hipertricose, alterações do timbre da voz, retenção hídrica, aumento do risco de doenças cardiovasculares, infertilidade, alterações de comportamento, da próstata e função imunológica. Além disso, sua ação mitogênica restringe o uso em pessoas com neoplasia (FRISOLI-JUNIOR, 2012; LEMOS *et al.*, 2013). O uso em crianças pode levar ao fechamento prematuro das epífises o que resultaria na diminuição do crescimento (SHAHIDI, 2001).

A verdadeira ação do fármaco no reparo ósseo ainda é bastante discutida. A melhor mineralização do calo ósseo, aumento da atividade osteoblástica e diminuição da osteoclástica são pontos chave (MOTA *et al.*, 2010; AHMAD *et al.*, 2013). Além disso, aumento da fosfatase alcalina óssea sérica, intensa formação de tecido ósseo lamelar e aumento na atividade osteoblástica foram observados em ratos osteotomizados (AHMAD *et al.*, 2013).

Em não união óssea atrofica em ratos o DN promoveu aumento significativo de regeneração óssea por aumento da atividade osteoblástica e redução da atividade osteoclástica, promoveu o aumento da massa óssea na cabeça femoral e em diferentes regiões da diáfise femoral. Mas, o percentual de colágeno não foi alterado (SENOS, 2014; SENOS *et al.*, 2019).

O real mecanismo de ação ainda é incerto (HEDSTROM *et al.*, 2002; KAPLANSKIÃ e DURNOVA, 2007; FUSATTO, 2010; MOTA *et al.*, 2010; SCHALCH *et al.*, 2013). Alguns fatores como aumento da proliferação e adesão dos osteoblastos (SCHALCH *et al.*, 2013); aumento na expressão de TGF-B promovendo a formação de tecido ósseo por promover a diferenciação de células primitivas em osteoblastos, inibição da síntese de proteases que degradam a matriz e sintetizam a matriz óssea (KASPERK *et al.*, 1997; FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Rozen *et al.* (2007) sugeriram alguns momentos específicos na qual o uso do DN seria viável, que varia desde a fase inflamatória até remodelamento ósseo final, isso é, durante quase todo o processo de consolidação óssea. Atuaria no hematoma devido estimulação da liberação de TGF-B1, PDGF, FGFs, na fase de recrutamento mesenquimal (fase inflamatória), no tecido de granulação e na ossificação endocontral (ROZEN *et al.*, 2007).

Estudos metabólicos com DN em seres humanos demonstraram os efeitos anticatabólicos e poupador de proteínas, benéficos sobre o metabolismo do cálcio em sua

menor taxa de excreção renal, maior absorção intestinal e aumento de massa óssea em indivíduos com osteoporose. Os efeitos anabólicos estão relacionados com a presença da enzima 5- α -redutase em tecidos com receptores andrógenos. Pela ação da 5- α -redutase a nandrolona passa à 5- α -dihidro-nandrolona (HOFBAUER e KHOSLA, 1999; KICMAN, 2008). Essa se liga mais fracamente aos receptores androgênicos do que a nandrolona (BELIDO *et al.*, 1995). Esse dado explica o efeito forte da nandrolona em tecidos destituídos de atividade alta de 5- α -redutase (SENOS, 2014).

4.6 Células-tronco de polpa dentária canina

Os dentes, nos mamíferos, se desenvolvem na mandíbula e na maxila. A morfologia dentária varia conforme à espécie, mas à estrutura (periodonto, dentina, esmalte e cimento) são similares entre os mamíferos (LEDESMA-MARTÍNEZ *et al.*, 2016; YEN; SHARPE, 2008).

A polpa dentária deriva-se de componentes ectodérmicos, sendo dividida em quatro camadas: mais externa (primeira), composta por odontoblasto produzindo dentina; sua segunda camada apresenta pouco tecido celular mas é rica em matriz extracelular; a terceira camada contém células progenitoras com plasticidade e pluripotência; já sua camada mais interna contém a área vascular e o plexo nervoso (GRAZIANO *et al.*, 2008; JEONG *et al.*, 2020).

Em 2000 isolou-se células tronco da polpa dentária, com a capacidade de proliferação, multipotencialidade, heterogeneidade, e de formar colônias *in vitro*. Além disso, descobriu-se que os dentes decíduos são ricos em células-tronco mesenquimais, com capacidade de proliferar, reparar componentes dentários danificados, induzir a regeneração óssea e tartar tecidos lesados (MIURA *et al.*, 2003; LEDESMA-MARTÍNEZ *et al.*, 2016; ABDELAZ *et al.*, 2019).

Os dentes decíduos apresentam benefícios para a produção de células tronco, pois não são órgãos vitais, são descartáveis, fácil acesso e apresentam elevado número de células-tronco. As células-tronco de tecido pulpar possuem alta capacidade de diferenciação, boas interatividades com biomateriais, sendo uma boa opção para reconstrução tecidual (BARROS *et al.*, 2001; GRAZIANO *et al.*, 2008; PINTO FILHO *et al.*, 2013; JEONG *et al.*, 2020). Em humanos as células-tronco de polpa dentária apresentaram a capacidade de auto-renovação, alto poder de proliferação, capacidade de diferenciação celular, sendo modelo para o estudo da diferenciação de células-tronco

adultas *in vitro* e regeneração de tecidos *in vivo* (LIMA et al., 2012; PINTO FILHO, 2013).

Outra importante característica dessas células são a capacidade de serem criopreservadas por períodos longos. Consequentemente é possível à criação de criobancos de células o que favoreceria sua utilização clínica (GRAZIANO et al., 2008; PERRY et al., 2008; WOODS et al., 2009; JEONG et al., 2020). Essas células podem diferenciar em osteócitos, odontoblastos e adipócitos, cardiomiócitos, condrócitos, osteoblastos, células hepáticas e células B das ilhotas do pâncreas e linhagens neurais (HUANG; SNYDER; CHENG, 2008; SOUZA, 2008; ISHKITIEV et al., 2010, PORTDAR; JETHMALANI, 2015). Isso demonstra a grande variabilidade de seu uso na medicina regenerativa (PORTDAR; JETHMALANI, 2015; JEONG et al., 2020).

Células-tronco isoladas da polpa dentária de cães foram capazes de diferenciar em linhagem odontoblástica funcional, com potencial de mineralização ativa *in vitro*. Além disso, apresentaram uma taxa superior de proliferação e diferenciação sobre as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana. Os resultados deste trabalho pode confirmar a utilização das células-tronco mesenquimal de polpa dentária canina na engenharia de tecidos dentários e, ainda, estabelece o cão como modelo adequado na pesquisa odontológica (DISSANAYAKA et al., 2011; FERNANDES et al., 2020).

As células-tronco mesenquimais derivadas da polpa dentária (DPSCs) são muito utilizadas na odontologia humana, devido a fácil coleta e baixa morbidade. Em comparação com células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea apresentam melhor habilidade em tecidos calcificados (PINTO FILHO et al., 2013; LEDESMA-MARTÍNEZ et al., 2016; ABDELAZ et al., 2019).

As CTMs foram isoladas dos tecidos dentais e mostraram ter maior proliferação e potencial de diferenciação multilinhagem do que as células estromais da medula óssea (BMSCs) (ABDELAZ et al., 2019; GRONTHOS et al., 2000). As células da polpa dentária (DPCs) são encontradas na região perivascular da polpa dentária e são compostas por uma população heterogênea de células, incluindo as MSCs. Considera-se que DPCs se originam da crista neural e expressam marcadores precoces para células-tronco mesenquimais e neuroectodérmicas (GRONTHOS et al., 2000; KOMADA et al., 2012). As DPCs são semelhantes às BMSCs, podendo se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, células endoteliais e neurônios funcionalmente ativos *in vitro* sob condições específicas (FERNANDES et al., 2020; GRONTHOS et al., 2000;

ARTHUR et al.; 2008). Além do mais, as DPCs produzem fatores neurotróficos e os expressam mais alto do que BMSCs (NOSRAT et al., 2001; NOSRAT et al, 2004; SAKAI et al. 2012). As DPCs caninas (cDPCs), podem fornecer benefícios terapêuticos para vários distúrbios neurológicos em cães e levar ao desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica em medicina veterinária (NAITO et al., 2015).

Considerando a aplicação clínica, o número de passagem de células pode se tornar uma questão importante que pode estar relacionada a vários fatores, incluindo o número de células necessárias para o transplante, rapidez para ganhar o número de células necessário, robustez da produção de fator neurotrófico e potencialmente tumorigênese. Embora não tenhamos comparado os efeitos do número de passagens na produção de fator neurotrófico, pensa-se que os DPCs em passagens mais jovens possuem potenciais neuroregenerativos mais robustos ao produzir maiores quantidades de fatores de crescimento. O uso de DPCs de terceira passagem relacionou-se à aplicação clínica em que o número total de células necessárias para o transplante deve ser obtido em um período de tempo razoavelmente curto (NAITO et al., 2015; LEDESMA-MARTÍNEZ et al., 2016).

Recentemente, foi demonstrado que a polpa dentária contém um nicho que protege os DPCs dos efeitos cumulativos de fatores genéticos e ambientais e mantém sua capacidade de autorrenovação devido ao ambiente ativo (KERKIS; CAPLAN, 2012; MENDONÇA COSTA, et al., 2008). A facilidade de coleta de tecido, alto rendimento inicial de células, baixo tempo de duplicação da população, plasticidade, capacidades multipotenciais e propriedades imunomoduladoras tornam os DPCs um candidato adequado para várias estratégias terapêuticas (DAVE; TOMAR; 2018).

Em estudo realizado por Naito e colaboradores (2015) demonstrou a viabilidade celular de cada passagem foi superior a 90% para diferentes tipos celulares. Da segunda passagem para a 12^a passagem, DPCs mantiveram maior potencial de proliferação do que BMSCs e fibroblastos, embora não houvesse diferenças significativas entre os três tipos de células. Além disso, as células da polpa dentária mantiveram sua proliferação até a 12^a passagem, enquanto as BMSCs e os fibroblastos mantiveram sua proliferação apenas até a quinta passagem e suas taxas de proliferação diminuíram gradativamente da sexta para a 12^a passagem.

DPCs mostram maior capacidade imunomoduladora devido à supressão de reações mediadas por células T e um padrão proliferativo mais alto in vitro na primeira semana de cultura em relação às MSCs de medula óssea (BM-MSCs). DPCs também

são uma fonte adequada de células-tronco multipotentes e podem ser mantidas por pelo menos 25 passagens (PIERDOMENICO et al., 2005; ZHANG et al., 2006; YAMADA et al., 2019). Relatórios anteriores demonstraram que as DPSCs têm maior potencial angiogênico, neurogênico e regenerativo do que as BM-MSCs (YAMADA et al., 2019). Iohara et al. demonstraram o isolamento de DPSCs altamente vasculogênicos que eram semelhantes às células progenitoras endoteliais da polpa dentária; esta técnica foi baseada nas diretrizes de boas práticas de fabricação (GMP) (DAVE et al., 2018).

Existem algumas diferenças entre DPCs e outras MSCs, uma vez que DPSCs expressam vários marcadores de células-tronco embrionárias e são multipotentes em relação a outras MSCs. Sob estímulos específicos, as DPCs podem se diferenciar em vários tipos de células diferentes, incluindo neurônios, odontoblastos, osteoblastos, adipócitos e condrócitos (DAI et al., 2012; DAVE et al., 2018). Além disso, os DPSCs começam a crescer exponencialmente no segundo dia e, na fase logarítmica, o tempo de duplicação da população é de 1,92 dias (DAI et al., 2012). Por essas razões, os DPSCs podem ser uma nova fonte de células para o tratamento de lesões em cartilagens.

Embora as morfologias de cDPCs e cBMSCs fossem surpreendentemente semelhantes, os resultados da cinética de crescimento indicaram que cDPCs mantiveram uma taxa de proliferação muito mais alta do que cBMSCs. Da mesma forma, foi comprovado que DPCs humanos retêm maior potencial proliferativo do que hBMSCs (MIURA et al. 2003; ALGE et al. 2010).

As propriedades imunomoduladoras dos DPSCs os posicionam como uma fonte celular mais útil para terapias baseadas em células para doenças imunológicas e relacionadas à inflamação (YAMADA et al., 2019). As DPCs não expressam o antígeno de classe II do complexo principal de histocompatibilidade em sua superfície e possuem propriedades imunorreguladoras que são capazes de induzir a apoptose de células T ativadas (ANITUA; TROYA; ZALDUENDO; 2018).

O transplante e os ensaios pré-clínicos demonstraram que as células-tronco da polpa dentária apresentam um forte potencial para medicina regenerativa, demonstrando sua capacidade de reparar tecidos sem a formação de neoplasias e de tratar distúrbios inflamatórios e imunológicos. No entanto, apenas alguns ensaios clínicos foram publicados até agora que investigam o potencial dos DPSCs para a cura, como para a engenharia do tecido ósseo, mas não para o reparo da cartilagem (YAMADA et al., 2019; BUENO; 2018; LEYENDECKER et al., 2018; PRADO et al., 2019).

A maioria dos autores concorda que as MSCs injetadas no local da lesão, como

no local da fratura ou intra-articular, são um sistema de entrega eficiente e minimamente invasivo e tendem a permanecer no local da injeção devido ao espaço confinado (SATUÉ et al., 2019). Satué et al. (29) demonstraram a segurança e eficácia de MSCs injetados intra-articular no joelho e declarou que as MSCs permaneceram na cavidade sinovial, enxertadas na lesão de cartilagem e foram detectáveis até 1 mês após a injeção; nenhum efeito adverso após a injeção foi observado. Outros autores também confirmaram a presença de CTMs na articulação do joelho em 3 meses (LEE et al., 2007), 8 semanas (PARK et al., 2017) e 14 dias após o implante (XIA et al., 2018).

4.7 Células-tronco como estimulador da consolidação óssea

A terapia celular tem atraído atenção clínica considerável para o tratamento de várias doenças por muitas décadas. Acredita-se que as células-tronco sejam uma fonte ideal de células para a terapia de reposição celular para doenças ósseas devido às suas propriedades de auto-renovação e plasticidade, que podem reparar ou regenerar os tecidos danificados. Os tipos de células-tronco do candidato incluem células do tronco embrionário (ES), células do tronco pluripotente induzido (iPS) e células estaminais somáticas, tais como MSCs (TAKAHASHI et al., 2007; AZIZI; STOKES; PROCKOP, 1998).

As MSCs se auto-renovam e crescer em tecidos específicos como ossos, adiposo e cartilagem. Na osteoporose os MSCs promovem a regeneração óssea e fortalecimento do tecido ósseo, portanto prevenindo fraturas patológicas. Os MSCs produzem tecido ósseo por dois mecanismos: diferenciação em células formadoras de tecido ósseo em um local danificado e atuando de forma paracrina, segregando certos fatores de crescimento que modificam o meio ambiente e recrutam células residentes para reparar o tecido lesionado (LEE et al., 2011; YE et al., 2014).

As MSC derivadas de tecido adiposo (AD-MSCs) são isoladas de tecidos adiposos através de uma abordagem minimamente invasiva e podem ser expandidas e diferenciadas em linhagens mesenquimais envolvidas na adipogênese, osteogênese e condrogênese (ARANA et al., 2013; STREM et al., 2005).

As AD-MSCs são mais facilmente isoladas, mais abundantes e produzem maiores rendimentos em termos de número de células em comparação com BM-MSC (KERN et al., 2006). No entanto, o rendimento de AD-MSCs e suas capacidades de

proliferação e diferenciação variam dependendo do local de colheita de tecidos (JURGENS et al., 2008) e da idade do doador (CHOUDHERY et al., 2014).

Ratos com osteoporose SAMP6 mostraram melhora significativa em vários parâmetros ósseos trabeculares após um único transplante intratibial de AD-MSC isogênicos (MIRSAIDI et al., 2014).

Os osteoblastos (OBs) são derivados de células do estroma medular da medula óssea (BM-MSCs), que podem se auto-renovar e se diferenciar em OBs, condrócitos ou adipócitos, enquanto os osteoclastos (OCs) são derivados de monócitos (EDWARDS; MUNDY, 2011; HARADA; RODAN, 2003, LACEY et al., 2012).

Estudos *in vivo* e *in vitro* sobre testosterona e outros hormônios do grupo dos andrógenos aumentaram um grande interesse devido às suas influências nas células-tronco (DI MAMBRO et al., 2010; HUANG et al., 2013a; HUANG et al., 2013b).

Recentemente, surgiram dúvidas sobre a ação da testosterona em células estaminais, MSCs ou EPCs circulantes. Estudos revelaram que o número dessas células aumenta significativamente de maneira dependente de testosterona por modulação de óxido nítrico (NO) sintetase em um receptor de androgênio RM (SWERDLOW et al., 2005; DI MAMBRO et al., 2010; PLACENCIO et al., 2010; WEST et al., 2012).

Além disso, a administração de testosterona em camundongos castrados restaura a trombocitopenia ocorrida após a castração (LIAO et al.; 2013).

Estudo indica que a estimulação *in vitro* com testosterona de células adultas (MSCs) e células progenitoras (EPCs) preserva a estrutura celular e aumenta significativamente a capacidade adesiva e proliferativa das células-tronco. Não obstante, estudos adicionais são necessários para determinar os mecanismos envolvidos no efeito da testosterona sobre MSCs e EPCs, sobrevivência e mobilização das células (RIBEIRO et al., 2014; LIANG et al., 2016; COROTCHI et al., 2016).

5 MATERIAL E MÉTODO

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo pelo número 7250220817 da CEUA. Este projeto propõe a comparação entre células tronco e/ou decanoato de nandrolona após osteotomia de avanço da tuberosidade da tíbia, com objetivo de verificar a diminuição do tempo de consolidação óssea pelo uso do anabolizante associado à aplicação das células tronco.

Realizou-se a pesquisa no Hospital Veterinário da Faculdade Anclivepa (HV-Faculdade Anclivepa), localizado na Rua Platina, 560, município de São Paulo, São Paulo e na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ-USP. Foram utilizados no mínimo 24 cães submetidos à cirurgias de avanço da tuberosidade da tíbia para a correção da instabilidade articular resultante da ruptura do ligamento cruzado cranial. Todos os animais tiveram a autorização prévia do tutor, segundo protocolo de pesquisa encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade Anclivepa.

Incluiu-se na pesquisa animais com faixa etária de 1 a 10 anos, machos e fêmeas, com 15 a 60 quilogramas de massa corporal, com diagnóstico de ruptura do ligamento cruzado cranial e ângulo do platô tibial inferior a 26°. O diagnóstico da doença do ligamento cruzado cranial foi realizado através da observação do teste de gaveta e tibial cranial positivos.

Para o planejamento cirúrgico os animais foram anestesiados ou sedados pelo serviço de anestesiologia do HV-Anclivepa São Paulo para a realização de exames radiográficos em projeção médio-lateral com o joelho flexionado a aproximadamente 135° como preconizado por Damur et al. (2005). A radiografia permitiu medir o ângulo do platô tibial (APT) que é definido pelo ângulo formado entre a inclinação do côndilo tibial medial em relação ao eixo mecânico da tíbia como preconizado por Hoffmann (2006), além de descartar anormalidades ósseas; avaliar a presença de doença articular degenerativa (DAD) e planejar o avanço da tuberosidade tibial.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos através de sorteio:

- grupo C (controle): realizou-se a técnica de TTA isoladamente;
- grupo CT (células tronco): realizou-se a técnica de TTA e o defeito resultante da osteotomia preenchido com $2,5 \times 10^6$ células tronco de polpa dentária canina ressuspendidas em 0,5 ml de solução PBS estéril no 15º dia.- No dia 22 pós-operatório

administraram-se mais $2,5 \times 10^6$ células, por via percutânea guiado por uma agulha e radiografia e ultrassonografia para ter certeza que as células tronco foram administradas na falha da osteotomia. A dose de células tronco foi padrão para todos os grupos. As células-tronco foram aplicadas em dois locais da osteotomia, isto é na parte cranial (distal ao cage) e na parte distal;

- grupo CTDN (células tronco associado com decanoato de nandrolona): a técnica de TTA e o defeito resultante da osteotomia preenchido com células tronco no dia 15 e 22 pós-cirúrgico e os animais receberam decanoato de nandrolona pela via intramuscular na dose de 2mg/kg no dia 15 e cada 21 dias de aplicação até a observação da consolidação óssea. Aplicou-se o anabolizante no membro contralateral ao do procedimento cirúrgico. A dose de células tronco foi padrão para todos os grupos. As células-tronco foram aplicadas em dois locais da osteotomia, isto é na parte cranial (distal ao cage) e na parte distal;

- grupo DN (decanoato de nandrolona): realizou-se a técnica de TTA e os animais receberão decanoato de nandrolona pela via intramuscular na dose de 2mg/kg após 15 dias do procedimento cirúrgico e a cada 21 dias até a observação da consolidação óssea. Aplicou-se o anabolizante no membro contralateral ao do procedimento cirúrgico.

Em todos os grupos realizou-se exames para avaliação da função renal (creatinina, úrea e urinálise) e hepática (fosfatase alcalina, alamina aminotransferase, albumina e gamaglutamiltransferase). Esses mesmo exames foram repetidos após 7 dias de pós-operatório e depois a cada 21 dias e a utilização do decanoato de nandrolona foi suspensa caso haja alterações séricas. Quadro 1 ao 3 encontram-se os valores de referências utilizados.

Quadro 1. Valores de referências do eritrograma utilizado no projeto.

Valor de referência					
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	VG ou Ht (%)	VCM (fL)	CHCM (%)	RDW
5,5-8.5	12-18	37-55	60-77	32-36	12-15

Jain, 1993; Meyer and Harvey, 2004

Quadro 2. Valores de referências do leucograma utilizado no projeto.

Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Valores absolutos (/ μL)					
	BAST	NEUT	LINF	MON	EOS	BAS
6,0-12,0	0-300	3000-11500	2500-7500	150-1350	100-1250	Raro

Jain, 1993; Meyer and Harvey, 2004

Quadro 3. Valores de referências dos bioquímicos utilizados no projeto.

Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	ALT (UI/L)	FA (UI/L)	ALB (g/dL)	GGT (UI/L)
21,4-59,92	0,5-1,5	21-73	20-156	2,6-3,3	1,2-6,4

Kaneko, 1997; Meyer & Harvey, 2004

Foram motivos de exclusão: anormalidades de coagulação; alterações do hemograma e bioquímica sérica no pré-cirúrgico; portadores de doenças que retardam a cicatrização como hiperadrenocorticismo, *Diabetes mellitus*, hipotireoidismo; uso de corticoterapia ou imunoterapia, contínuo ou três meses antes da cirurgia; animais com fise aberta. Pacientes que tiveram osteomielite e não compareceram nas datas propostas para as avaliações tb foram excluídos do estudo.

Colocou-se dentro de um pote 6 papéis com as letras C (grupo controle), CT (grupo células-tronco), CTDN (grupo células-tronco e aplicação de decanoato de nandrolona) e DN (grupo decanoato de nandrolona). No dia do procedimento cirúrgico o anestesista retirava um papel para saber em qual grupo o determinado animal entraria.

Os animais que apresentaram osteoartrose (OA) maior que grau II, segundo à escala de Dymond et al. (2010) descrita na tabela 1, foram excluídos. Realizou-se a classificação OA pelo Médico Veterinário responsável por todos os procedimentos cirúrgicos, pois o mesmo observou essas alterações, se existentes, no transoperatório. A avaliação da osteoartrose foi realizada através das avaliações das imagens radiográficas na posição mediolateral e craniocaudal.

Tabela 1 - Características dos quatro graus utilizados pelo Médico Veterinário para avaliar o grau de osteoartrose dos cães submetidos ao avanço da tuberosidade tibial - São Paulo – 2019.

Grau	Característica
0	Sem sinais de osteoartrose
1	Alterações leves/pequenas de osteófitos
2	Alterações moderadas/moderada formação de osteófitos
4	Alterações severas/grande formação de osteófitos

Fonte: Dymond et al. (2010) adaptado por Ferreira (2013).

5.1 Procedimento cirúrgico

Realizou-se o acesso cirúrgico para a TTA com incisão parapatelar medial seguido de artrotomia medial e sub-patelar para inspeção dos meniscos com auxílio de afastadores de Gelpi e um retrator de joelho, respectivamente. Realizou-se incisão da cápsula articular, fibrocartilagem parapatelar medial, fâscia medial e músculo vasto medial e parte cranial do sartório para artrotomia, inspeção e tratamento do menisco medial ou lateral quando necessário.

Meniscos lesionados foram tratados por remoção da porção destacada ou meniscectomia parcial, dependendo da gravidade da lesão com auxílio de uma lâmina de bisturi número 11. Suturou-se a cápsula articular parcialmente com fio poliamida em padrão Sultan, sem entrar no lúmen articular.

Posteriormente, realizou-se acesso da crista da tibia até a diáfise tibial com divulsão dos tecidos moles (elevação do corpo do músculo sartório e poneurose do músculo gracilis, semi-membranoso e semi-tendinoso), incisão do periósteo até a exposição, visualização de toda a crista da tibia e demarcação da osteotomia com bisturi número 11 ou com o bisturi elétrico. Após, a osteotomia realizou-se com auxílio de serra oscilatória. Em seguida a placa bloqueada apropriada (Focus™) foi fixada ao fragmento da crista da tibia, a osteotomia completada e a crista avançada e devidamente ancorada com o *cage* previamente selecionado no estudo radiográfico e a placa fixada à diáfise tibial, como descrito por Tepic (2002) (FIGURA 1).

Selecionou-se o tamanho do espaçador/*cage* com base nas radiografias e escolhido aquele que permitia o avanço da crista tibial até o ponto em que o tendão patelar e olatô tibial estivessem em ângulo de 90 graus. Posteriormente realizou-se a rafia de periósteo e subcutâneo com poliamida padrão Sutan e Zig-Zag, respectivamente.

Realizou-se Dermorrafia com náilon padrão simples separado.

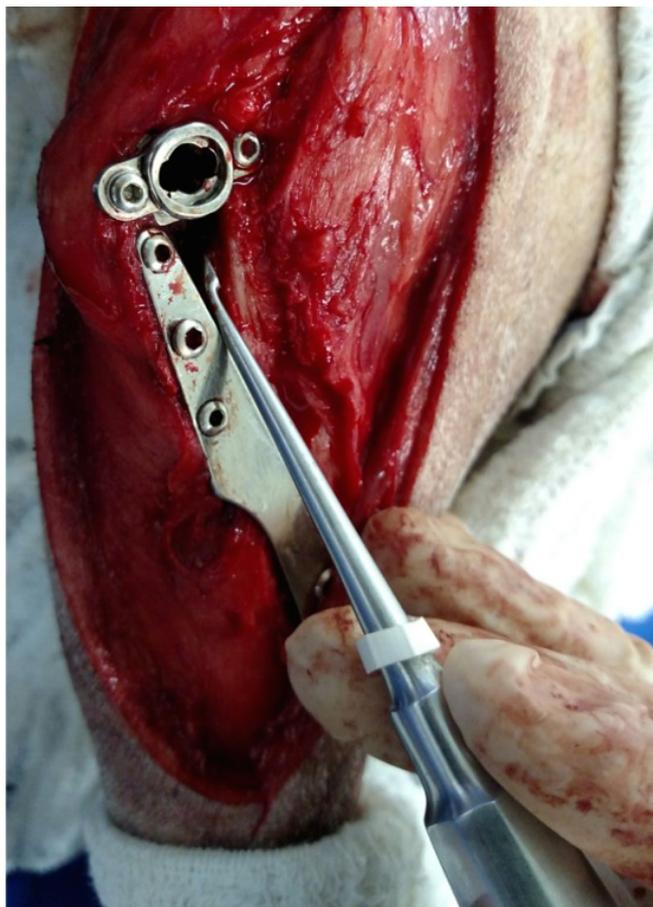


Figura 1. Técnica de TTA com observação da falha óssea criada (ponta da cureta). Fonte: MARQUES (2019).

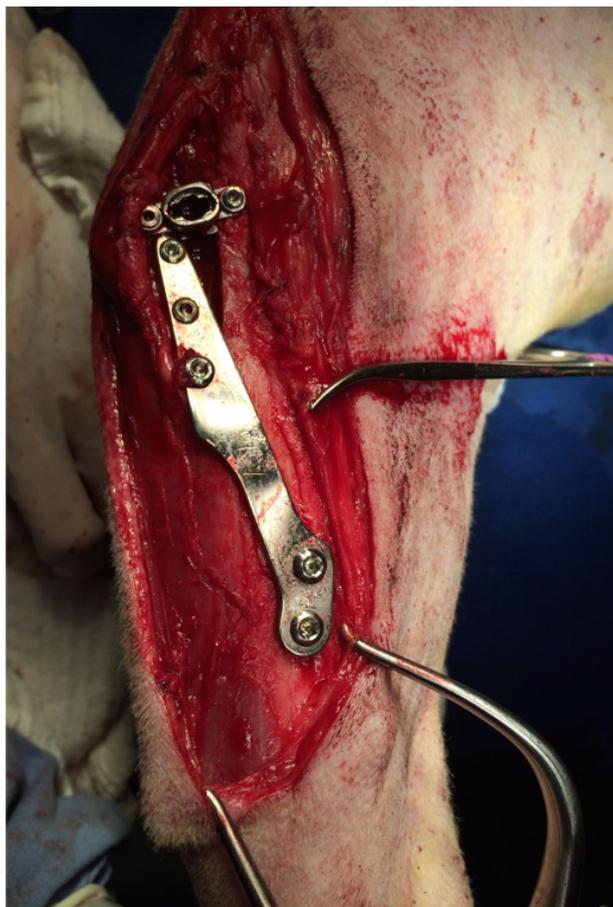


Figura 2. Observa-se a realização da técnica da TTA com a colocação do cage e placa, e a criação da falha óssea. Fonte: MARQUES (2019).

5.2 Pós-operatório

No pós-operatório imediato, foram realizadas radiografias em projeções craniocaudal e mediolateral (FIGURA 2) para avaliação do alinhamento e posição dos implantes. A prescrição pós-operatória incluiu cefalexina 30 mg/kg a cada 12 horas durante 7 dias, carprofeno 2.2mg/kg a cada 12 horas durante 7 dias, dipirona 25 mg/kg a cada 8 horas durante 10 dias, cloridrato de tramadol na dose de 3 mg/kg a cada 8 horas durante 7 dias e colar protetor até a retirada dos pontos. Após 15 dias, os animais retornaram ao HV-Anclivepa São Paulo para retirada dos pontos e avaliação ortopédica, aplicação de células tronco (Grupo CT e CTDN) e aplicação de decanoato de nandrolona (Grupo DN e CTDN).

5.3 Aplicação de decanoato de nandrolona (DN)

Aplicou-se o DN por via intramuscular profunda no músculo semitendinoso, semimembranoso ou quadríceps. Utilizou-se a dose de 2 mg/kg no dia 15 e a cada 21

dias até a observação da consolidação óssea.

5.4 Aplicação de células tronco na falha óssea

As células tronco foram cultivadas no Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo (FMZ-USP). $2,5 \times 10^6$ células ressuspendidas em 0,5 mL de solução tampão estéril foram acondicionadas em gelo e trazidas para o Hospital da Anclivepa São Paulo. As células foram aplicadas em no máximo 2 horas de intervalo entre saída da USP e o HV-Anclivepa São Paulo. As células-tronco foram avaliadas antes do projeto para provar sua viabilidade após duas horas dos seu processamento. Constatando que mais de 95% das células-tronco estavam viáveis mesmo após o transporte em gelo.

A aplicação das células ocorreu no dia 15 e dentro do centro cirúrgico com utilização de gorro, máscara e luva cirúrgica estéril. Para aplicação das células tronco realizou-se tricotomia e antissepsia prévia com clorexidine degermante no local da aplicação. Para aplicação das células o cirurgião responsável colocou luva estéril e pano de campo. Aplicou-se as células tronco na falha óssea da osteotomia criada pela TTA com auxílio da palpação digital do cage e da placa, e guiado pela ultrassonografia. Aplicou-se na região crinial da osteotomia (caudal ao cage) e distal (próxima a placa de TTA) (Figura 3) e radiologia (Figura 4).



Figura 3. Ecografia utilizada para guiar o local da falha óssea, na qual administrou-se células tronco. Fonte: MARQUES (2019).



Figura 4. Radiografia na posição mediolateral com utilização de uma agulha 25x7 para saber o local da osteotomia e administração de células-troncos na região cranial da osteotomia. Visualiza-se a agulha próxima ao cage e a placa de TTA. Fonte: MARQUES (2019).

5.5 Estudo radiográfico da consolidação óssea

Os animais foram radiografados com aparelho Medicor Budapest da marca Neo-Diagnomax com potencia de 500 mA para a produção dos raios-X. O processamento da imagem realizou-se por meio da radiologia computadorizada, da marca Agfa Health Care modelo CR 30-X. Realizou-se individualmente no pré-operatório, pós-operatório imediato e a cada 21 dias em duas projeções: mediolateral (LL) e ventrodorsal (VD) até

a observação da consolidação óssea. No momento das radiografias os animais foram anestesiados ou sedados para melhor posicionamento sobre a mesa de raio-X.

Realizou-se a avaliação da consolidação óssea utilizando o método visual e mensuração da densidade óssea utilizando o penetrômetro.

Avaliou-se a densidade a cada 21 dias em projeção médio lateral e ventrodorsal utilizando um calibrador e penetrômetro de alumínio de 12 degraus (FOCUS® - Figura 5 e 6) que foi posicionado ao lado do animal no momento das radiografias (ao lado da tíbia, na mesma altura para evitar distorção de imagem). As imagens foram digitalizadas e analisadas por meio de programa computacional de processamento e análise de imagem ImageLab®, desenvolvido pela empresa Softium de Informática Ltda. Me. Para cada imagem digitalizada será padronizado os valores de densidade óptica (DO) dos degraus da escala de alumínio, selecionando os 12 degraus da escala. Sendo que cada degrau corresponde a uma tonalidade para o programa ImageLab®, após será criado um gráfico representando a curva densiométrica, cujo eixo “x” representa as DO (de 1 a 12) e o eixo “y” representa os tons de cinza, que variam neste programa de 0 (preto) a 256 (branco) tons. Serão demarcadas as três regiões de interesse, nas duas projeções proposta. Cada região será padronizada com 1 x 1 cm de área na imagem da tela em tamanho real. As selecionadas regiões de interesse serão obtidos os valores de DO para cada uma delas através da ferramenta “cálculo de regiões” O valor de DO é obtido em milímetros de alumínio (mmAl), uma vez que o tom de cinza obtido na região de interesse é comparado aos tons do penetrômetro. Para cada região a ser analisada será realizado três mensurações a fim de se obter um valor médio para cada região. A consolidação será considerada quando o tom de cinza estiver 256 (branco).

Realizou-se a avaliação radiográfica por três operadores, sendo eles: 2 docentes na área de radiologia e 1 ortopedista. As radiografias foram numeradas aleatoriamente e entregues aos avaliadores, que realizaram sua avaliação sem saber a qual grupo pertencem os animais. O estudo foi duplo cego para os avaliadores, estes não sabendo em qual grupo pertencia o animal avaliado. Todos os avaliadores avaliaram as imagens em todos os tempos estudados (pré-operatório, pós-operatório imediato e a cada 21 dias até a observação da consolidação óssea). A osteotomia foi considerada consolidada quando 2 dos 3 avaliadores disseram que aquele determinado tempo observou-se a consolidação óssea. Os avaliadores tinham duas repostas para a avaliação da consolidação óssea: SIM (osteotomia consolidada) ou NÃO (osteotomia não consolidada).



Figura 5. Visualização do penetrômetro (vista lateral) utilizado para avaliar o tempo de consolidação da falha óssea criado pela TTA. Fonte: MARQUES (2018).



Figura 6. Visualização do penetrômetro (vista de cima) utilizado para avaliar o tempo de consolidação da falha óssea criado pela TTA. Fonte: MARQUES (2018).

Figura 7 observa-se uma TTA consolidada, com o uso do penetrômetro do lado da radiografia mediolateral para observa-se a consolidação óssea da falha.



Figura 7. Visualização da consolidação óssea após 42 dias no grupo CTDN. Observa-se a direita o penetrômetro. Fonte: MARQUES (2019).

5.6 Análise estatística

Os dados adquiridos: raça, peso, idade, ângulo do platô tibial, lado acometido e tempo de consolidação óssea, foram armazenados em planilha Excel. O programa IBM SPSS *statistics* v. 20.0 foi utilizado para realizar a análise estatística. Foram descritas as variáveis categóricas por frequências absolutas. As variáveis quantitativas foram descritas pela mediana, o mínimo e o máximo. Foram associadas as variáveis categóricas pelo teste Exato de Fisher e as quantitativas pelo teste de Kruskal Wallis.

Conforme Bielefeldt e colaboradores (2012), para amostras de tamanho menor ou igual a 10, recomenda-se não proceder ao teste de normalidade e partir diretamente para uma estratégia não-paramétrica de análise. Como os grupos tiveram tamanho de amostra de 6 optamos por esta abordagem. Foi considerado um nível de significância de 5% para as comparações estabelecidas.

5.7 Questionário de qualidade de vida

Após 11 meses do procedimento cirúrgico os proprietários responderam a um questionário com perguntas sobre os hábitos diários o seu animal. Essa avaliação foi feita de uma forma geral e específica para cada grupo. Como é observado nos quadros abaixo.

Nome do tutor: _____

Nome do animal tratado: _____

Veterinário responsável pelo procedimento: **Dr. Danilo Roberto Custódio Marques**

Quadro 2: Estas questões devem ser respondidas pelos tutores cujos cães passaram por procedimento cirúrgico. Para cada pergunta, assinale com um X sua avaliação de 1 a 4 (animais de todos os grupo).

Nº	Questão	Nota
1	Achou que o procedimento cirúrgico foi invasivo?	1. Muitíssimo 2. Muito 3. Pouco 4. Não
2	Teve alguma complicação no pós-operatório?	1. Muitíssimo 2. Muito 3. Pouco 4. Não
3	Quanto foi complicado cuidar no animal no pós-operatório?	1. Muitíssimo 2. Muito 3. Pouco 4. Não
4	Acha que o paciente tem dor no local do procedimento cirúrgico?	1- Muitíssimo 2- Muito 3- Pouco 4- Não
5	Quanto a cirurgia foi benéfica ao seu animal?	1- Muitíssimo 2- Muito 3- Pouco 4- Não
6	Animal apresentou claudicação?	1- Muitíssimo 2- Muito

		3- Pouco 4- Não
7	Aparecimento de alguma tipo de câncer ou nódulo não identificado?	1. Sim 2. Não

Quadro 3. Estas questões devem ser respondidas SOMENTE pelos tutores cujos cães receberam o anabolizante. Para cada pergunta, assinale com um X sua avaliação de 1 a 4 (Grupo DN e CTDN).

Nº	Questão	Nota
1	Durante o uso de anabolizante o animal ganhou massa muscular?	1- Muitíssimo 2- Muito 3- Pouco 4- Não
2	Animal chegou a apresentar aumento de libido com uso no anabolizante?	1- Muitíssimo 2- Muito 3- Pouco 4- Não
3	Observaram alterações de comportamento?	1- Muitíssimo 2- Muito 3- Pouco 4- Não
4	Se marcou SIM na pergunta acima, qual alteração observou?	Resposta:
5	Aparecimento de alguma tipo de câncer ou nódulo não identificado?	1- Sim 2- Não

Quadro 4. Responda as questões do próximo quadro SOMENTE se seu cão recebeu células tronco (Grupo CT e CTDN).

Nº	Questão	Resposta
1	Você achou o método de aplicação das células invasivo?	1- Muitíssimo 2- Muito 3- Pouco 4- Não
2	Você acha que seu animal sentiu desconforto no momento da aplicação das células tronco?	1- Muitíssimo 2- Muito 3- Pouco 4- Não
3	Observou algum tipo de reação no local de aplicação das células tronco?	1- Sim 2- Não
4	Se marcou SIM na questão 3, qual alteração foi observada?	Resposta:

5	Observaram alterações de comportamento? Se sim, quais? Resposta:	1- Muitíssimo 2- Muito 3- Pouco 4- Não
6	Aparecimento de alguma tipo de câncer ?	1- Sim 2- Não

Quadro 5. Questionário para avaliação de qualidade de vida dos animais. Todos os proprietários devem preencher este quadro (todos os grupos).

Nº	Questão	Nota
1	Você acha que a doença atrapalhava a vida do animal?	1. Muitíssimo 2. Muito 3. Não
2	Você acha que seu animal sentia dor?	1. Sempre 2. Raramente 3. Não
3	O seu animal tem episódios de vômitos?	a) Sempre b) Raramente c) Não
4	Como está o intestino do seu animal?	1. Péssimo 2. Ruim 3. Quase normal 4. Normal
5	Como está o apetite do seu animal?	1- Aumentou muito 2- Aumentou pouco 3- Normal 4- Diminui pouco 5- Diminuiu muito
6	Seu animal se cansa facilmente?	1- Sempre 2- Frequentemente 3- Pouco 4- Não
7	Animal continua mantendo seus hábitos diários normalmente?	1- Sim 2- Não
8	Como esta o sono do seu animal?	1) Muito ruim 2) Ruim 3) Normal 4) Bom 5) Muito bom
9	Quanta atenção seu animal está dando para a família? (brincar, participar de atividades, interação)	1- Está indiferente 2- Pouca atenção 3- Normal 4- Muita atenção
10	Seu animal se posiciona sozinho para fazer suas necessidades?	1- Nunca mais conseguiu 2- Raramente consegue

		3- às vezes consegue 4- Consegue normalmente
11	Como está o comportamento do seu animal?	1- Totalmente alterado 2- Episódios de alteração 3- Mudou pouco 4- Normal
12	O seu animal manteve os hábitos de higiene (se lambar, etc)?	1- Está normal 2- Está se limpando menos
13	Quanto a avaliação sobre o tempo de recuperação do seu animal, como avalia?	1- Muito longo 2- Longo 3- Aceitável 4- Curto 5- Muito curto
14	Quão satisfeito você ficou com a cirurgia?	1- Muito satisfeito 2- Satisfeito 3- Pouco satisfeito 4- Insatisfeito
15	Como você avalia a qualidade de vida do seu animal após o tratamento?	1- Melhorou 2- Está igual a antes 3- Está pior

Coloque aqui qualquer outra observação que considerar importante:

6 RESULTADOS

Os dados relacionados a raça, idade, ângulo do platô tibial (APT^o), membro acometido e tempo de consolidação óssea nos grupos encontram-se abaixo nas Tabelas de 2 a 5. Cinco animais foram excluídos do projeto: um por desenvolvimento de osteomietite, um por quebra de implante e três devido aos proprietários não retornarem para as avaliações posteriormente. O tempo cirúrgico vario-se de 54 minutos a 1 hora e 23 minutos. O tempo médio dos procedimentos cirurgicos foram de 1 hora e 3 minutos. Todos os cages utilizados para a realização da TTA foi tamanho 9 mm.

No Quadro 5 encontram-se a média de peso, idade, APT^o e tempo de consolidação óssea encontrados nos grupos estudados.

Tabela 2. Raça, peso, idade ângulo do platô tibial (APT^o), membro operado e tempo de consolidação do Grupo Controle (Grupo C).

Raça	Peso (Kg)	Idade (anos)	APT^o	Lado acometido	Tempo de consolidação (dias)
SRD	19	4	25	Direito	84
Labrador	43	9	22	Esquerdo	84
SRD	18.5	8	23	Direito	105
SRD	23.5	6	25	Esquerdo	84
Pastor Alemão	32	4	23	Direito	84
Golden Retriever	37	5	26	Esquerdo	105

Tabela 3. Raça, peso, idade ângulo do platô tibial (APT^o), membro operado e tempo de consolidação do Grupo decanoato de nandrolona (Grupo ND).

Raça	Peso (Kg)	Idade (anos)	APT^o	Membro operado acometido	Tempo de consolidação (dias)
Pit Bull	45	3	24.5	Direito	63
Pit Bull	42	3.5	22	Esquerdo	63
Labrador	32	7	22.5	Esquerdo	63
SRD	22	4	21	Direito	42
SRD	29	3.4	23.3	Esquerdo	63
SRD	28	5.2	25.7	Direito	63

Tabela 4. Raça, peso, idade ângulo do platô tibial (APT^o), membro operado e tempo de consolidação do Grupo com uso de células tronco na falha óssea (Grupo CT).

Raça	Peso (Kg)	Idade (anos)	APT^o	Membro operado acometido	Tempo de consolidação (dias)
SRD	23,3	5,1	22	Direito	63
Rottweiler	42,1	6	23	Direito	63
Pit Bull	28,3	4	25	Esquerdo	84
Akita	23,4	7	20	Direito	84
Pit Bull	31	3,5	21	Esquerdo	84
SRD	27,6	4,6	24	Esquerdo	63

Tabela 5. Raça, peso, idade ângulo do platô tibial (APT^o), membro operado e tempo de consolidação do Grupo decanoato de nandrolona associado com aplicação de células tronco na falha óssea (Grupo CTDN).

Raça	Peso (Kg)	Idade (anos)	APT^o	Membro operado acometido	Tempo de consolidação (dias)
Labrador	34,7	3,6	23	Esquerdo	42
Chow Chow	18	3,2	25	Esquerdo	42
SRD	32	2,5	22	Direito	42
SRD	23	7	21	Esquerdo	42
Labrador	32,4	6	23	Direito	63
Pit Bull	28,1	5	22	Direito	42

Foram coletados os dados (raça, peso, idade, ângulo do platô tibial e lado acometido) de 24 cães submetidos à cirurgia de avanço da tuberosidade da tíbia para a correção da instabilidade articular resultante da ruptura do ligamento cruzado cranial. As características dos cães são apresentadas na Tabela 6. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para raça, peso, idade, ângulo do platô tibial nem lado acometido.

Não observaram alterações nos hemogramas e bioquímicos realizados a cada 21 dias do procedimento. Serão realizadas as avaliações com uso do penetrômetro para a publicação do artigo na revista.

Tabela 6.- Tabela comparativa das características dos grupos estudados.

Grupos	Grupo C n=6	Grupo ND n=6	Grupo CT n=6	Grupo CTDN n=6	P
Raça					0,824
Akita	-	-	1	-	
Chow-chow	-	-	-	1	
Golden Retriever	1	-	-	-	
Labrador	1	1	-	2	
Pastor Alemão	1	-	-	-	
Pit bull	-	2	2	1	
Rottweiler	-	-	1	-	
SRD	3	3	2	2	
Peso (Kg)	27,8 (18,5-43,0)	30,5 (22,0-45,0)	28,0 (23,3-42,1)	30,1 (18,0-34,7)	0,859
Idade (anos)	5,5 (4,0-9,0)	4,0 (3,0-7,0)	5,0 (4,0-7,0)	4,5 (2,0-7,0)	0,380
Ângulo do platô tibial (°)	24,0 (22,0-26,0)	22,9 (21,0-25,7)	22,5 (20,0-25,0)	22,5 (21,0-25,0)	0,408
Lado acometido					1,000
Direito	3	3	3	3	
Esquerdo	3	3	3	3	

Variáveis categorizadas descritas por frequências absolutas e associadas pelo teste Exato de Fisher e quantitativas descritas pela mediana (mínimo-máximo) e comparadas pelo teste de Kruskal Wallis. Grupo C: Grupo controle; Grupo D: Grupo decanoato de nandrolona; Grupo CT: Grupo com uso de células tronco na falha óssea; Grupo CTDN: Grupo decanoato de nandrolona associado com aplicação de células tronco na falha óssea.

Ao comparar os tempos de consolidação entre os grupos houve diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,001$). A diferença ocorreu entre os grupos controle (Grupo C) e decanoato de nandrolona (Grupo DN) (84 versus 63 dias, $P = 0,034$) e entre os grupos controle (Grupo C) e decanoato de nandrolona associado com aplicação de células tronco na falha óssea (Grupo CTDN). (84 versus 42, $P < 0,001$). Não houve outras diferenças estatisticamente significativas. Porém, houve uma diferença no limite da significância escolhida entre o grupo com uso de células tronco na falha óssea (Grupo CT) e o grupo decanoato de nandrolona associado com aplicação de células tronco na falha óssea (Grupo CTDN). (73,5 versus 42 dias, $P = 0,050$). Tabela 7.

Tabela 7.- Tabela comparativa do tempo de consolidação em dias entre os grupos.

Grupos	Grupo C n=6	Grupo ND n=6	Grupo CT n=6	Grupo CTDN n=6	P
Tempo de consolidação	84,0 ^a (84,0-105,0)	63,0 ^b (42,0-63,0)	73,5 ^{a,b} (63,0-84,0)	42,0 ^b (42,0-63,0)	<0,001

Dados apresentados pela mediana (mínimo e máximo). Grupo C: Grupo controle; Grupo ND: Grupo decanoato de nandrolona; Grupo CT: Grupo com uso de células tronco na falha óssea; Grupo CTDN: Grupo decanoato de nandrolona associado com aplicação de células tronco na falha óssea. ^{a,b}: letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas. Comparação realizada através do teste de Kruskal Wallis.

No Gráfico 1 *dotplot* são apresentados estes resultados comparativos entre os tempos de consolidação da osteotomia entre os grupos. Cada ponto representa o tempo de consolidação de cada animal. A linha horizontal que percorre os grupos é a mediana de tempo de consolidação do grupo. As significâncias estatísticas são apresentadas para os grupos que diferiram de forma estatisticamente significativa.

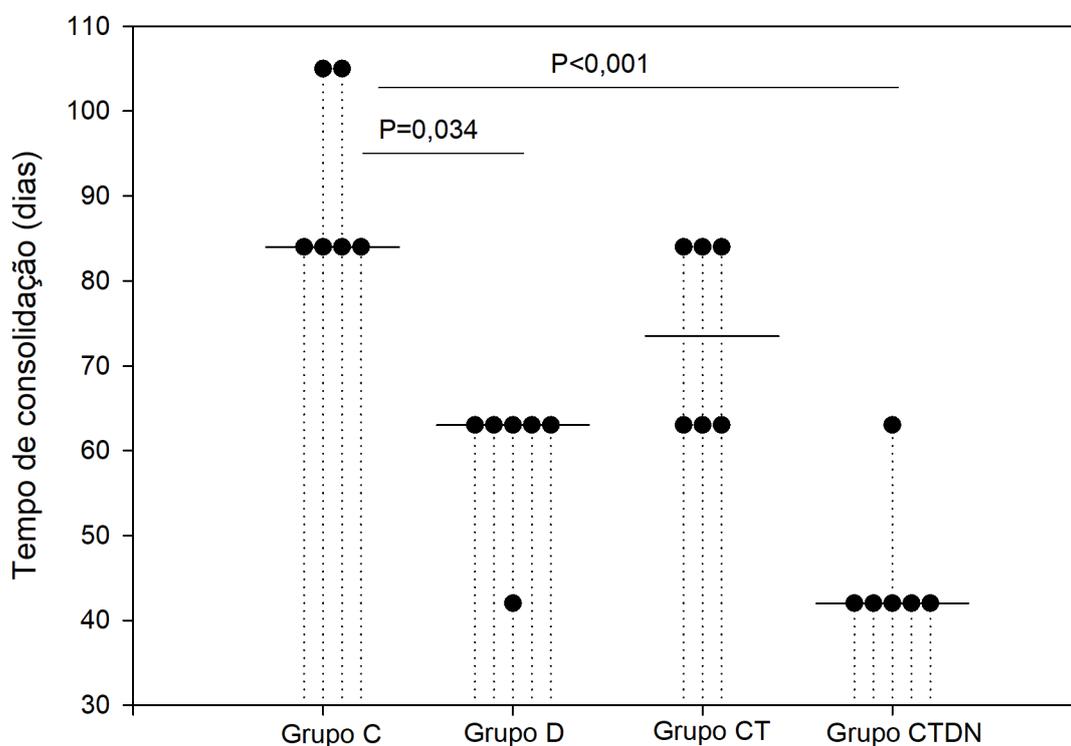


Gráfico 1.- Gráfico comparativo do tempo de consolidação em dias entre os grupos. Observando diferença estatística no tempo de consolidação óssea do grupo CTDN em

relação aos outros grupos. Além no mais, observa-se menor tempo de consolidação de todos os grupos em relação ao grupo C.

Quadro 6: Questionário respondido por todos os tutores dos pacientes que passaram pelo ato cirúrgico (TODOS animais do projeto).

Nº	Questão	Nota
1	Achou que o procedimento cirúrgico foi invasivo?	Muitíssimo – 0 (0%) Muito – 3 (12,5%) Pouco – 16 (66,67%) Não – 5 (20,83%)
2	Teve alguma complicação no pós-operatório?	Muitíssimo – 0 (0%) Muito – 0 (0%) Pouco – 2 (8,33%) Não – 22 (91,66%)
3	Quanto foi complicado cuidar no animal no pós-operatório?	Muitíssimo – 2 (8,33%) Muito – 4 (16,67%) Pouco – 6 (25%) Não – 12 (50%)
4	Acha que o paciente tem dor no local do procedimento cirúrgico?	Muitíssimo – 0 (0%) Muito – 0 (0%) Pouco - 3 (12,5%) Não - 21 (87,5%)
5	A cirurgia foi benéfica ao seu animal?	Muitíssimo – 23 (95,83%) Muito – 1 (4,16%) Pouco – 0 (0%) Não – 0 (0%)
6	Animal apresenta claudicação?	Muitíssimo Muito Pouco – 4 (16,67%) Não – 20 (83,33%)
7	Aparecimento de alguma tipo de câncer ou nódulo não identificado?	Sim – 1 (4,16%) Não – 23 (95,83%)

Quadro 7. Resultados dos dados encontrados das respostas das questões na qual utilizou-se anabolizante (SOMENTE os pacientes do grupo DN e CTDN).

Nº	Questão	Resultado Número de animais e %
1	Durante o uso de anabolizante o animal ganhou massa muscular	Muitíssimo – 0 (0%) Muito – 6 (50%) Pouco – 4 (33,33%) Não – 2 (16,67%)
2	Animal chegou a apresentar aumento de libido com uso no anabolizante?	Muitíssimo – 0 (0%) Muito – 0 (0%) Pouco – 2 (16,67%) Não – 10 (83,33%)
3	Observaram alterações de comportamento?	Muitíssimo – 0 (0%) Muito – 0 (0%) Pouco – 0 (0%) Não – 12 (100%)
4	Se marcou SIM na pergunta acima, qual alteração observou?	Resposta:
5	Aparecimento de alguma tipo de câncer ou nódulo não identificado?	Sim – 0 (0%) Não – 12 (100%)

Quadro 8. Respostas das questões do próximo quadro SOMENTE se seu cão recebeu células tronco (animais do grupo CT e CTDN).

Nº	Questão	Resposta
1	Você achou o método de aplicação das células invasivo?	Muitíssimo – 0 Muito - 0 Pouco - 2 (16,67%) Não – 10 (83,33%)
2	Você acha que seu animal sentiu desconforto no momento da aplicação das células tronco?	Muitíssimo – 0 (0%) Muito – 0 (0%) Pouco – 2 (16,67%) Não – 10 (83,33%)
3	Observou algum tipo de reação no local de aplicação das células tronco?	Sim – 2 (16,67%) Não – 10 (83,33%)
4	Se marcou SIM na questão 3, qual alteração foi observada?	Resposta: Prurido no local e eritema
5	Observaram alterações de comportamento? Se sim, quais? Resposta:	Muitíssimo – 0 (0%) Muito – 0 (0%) Pouco – 0 (0%) Não – 12 (100%)
6	Aparecimento de alguma tipo de câncer ?	Sim – 0 (100%) Não – 12(100%)

Quadro 9. Questionário para avaliação de qualidade de vida dos animais. Todos os proprietários devem preencher este quadro.

Nº	Questão	Nota
1	Você acha que a doença atrapalhava a vida do animal?	Muitíssimo - 21 (87,5%) Muito - 3 (12,5%) Não - 0 (0%)
2	Você acha que seu animal sentia dor?	Sempre - 24 (100%) Raramente - 0 (0%) Não - 0 (0%)
3	O seu animal tem episódios de vômitos?	Sempre - 0 (0%) Raramente - 1 (4,16%) Não - 23 (95,83%)
4	Como está o intestino do seu animal?	Péssimo - 0 (0%) Ruim - 0 (0%) Quase normal - 0 (0%) Normal - 24 (100%)
5	Como está o apetite do seu animal?	Aumentou muito - 0 (0%) Aumentou pouco - 6 (25%) Normal - 17 (70,83%) Diminui pouco - 1 (4,16%) Diminuiu muito - 0 (%)
6	Seu animal se cansa facilmente?	Sempre - 0 (0%) Frequentemente - 0 (0%) Pouco - 1 (4,16%) Não - 23 (95,83%)
7	Animal continua mantendo seus hábitos diários normalmente?	Sim - 24 (100%) Não - 0 (0%)
8	Como esta o sono do seu animal?	Muito ruim - 0 (0%) Ruim - 0 (0%) Normal - 24 (100%) Bom - 0 (0%) Muito bom - 0 (0%)
9	Quanta atenção seu animal está dando para a família?	Está indiferente - 0 (0%) Pouca atenção - 1 (4,16%)

	(brincar, participar de atividades, interação)	Normal – 20 (83,34%) Muita atenção – 3 (12,5%)
10	Seu animal se posiciona sozinho para fazer suas necessidades?	Nunca mais conseguiu – 0 (0%) Raramente consegue – 0 (0%) Às vezes consegue – 0 (0%) Consegue normalmente – 24 (100%)
11	Como está o comportamento do seu animal?	Totalmente alterado – 0 (0%) Episódios de alteração – 0 (0%) Mudou pouco – 0 (0%) Normal – 24 (100%)
12	O seu animal manteve os hábitos de higiene (se lambar, etc)?	Está normal – 24 (100%) Está se limpando menos – 0 (0%)
13	Quanto a avaliação sobre o tempo de recuperação do seu animal, como avalia?	Muito longo – 0 (0%) Longo - 2 (8,33%) Aceitável - 7 (29,17%) Curto – 10 (41,67%) Muito curto – 5 (20,83%)
14	Quão satisfeito você ficou com a cirurgia?	Muito satisfeito – 18 (75%) Satisfeito – 6 (25%) Pouco satisfeito – 0 (0%) Insatisfeito – 0 (0%)
15	Como você avalia a qualidade de vida do seu animal após o tratamento?	Melhorou - 21 (87,5%) Está igual a antes – 3 (12,5%) Está pior – 0 (0%)

7 DISCUSSÃO

Os animais participantes do projeto foram selecionados de forma homogênea e aleatória, evitando assim, possíveis alterações nos resultados entre os grupos. Com isso, não observou-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para raça, peso, idade, ângulo do platô tibial nem lado acometido. A escolha dos animais que participaram dos grupos foi aleatória, através do sorteio (pote com papéis dos grupos, 6 papéis de cada grupo).

Adotou-se a TTA como modelo nesse estudo devido a criação de uma falha homogênea, ocorrência de uma consolidação secundária e facilidade do acompanhamento radiográfico pós-operatório. Essa técnica já foi utilizada como modelo de consolidação óssea em outros estudos (BOUDRIEAU, 2011; MARQUES, 2017, SILVEIRA, 2013). Utilizou-se esse modelo em nosso estudo devido a alta incidência de ruptura do ligamento cruzado em cães, a TTA ser modelo para estudos de consolidação óssea em cães, ser uma osteomia (não influencia de trauma adicional em partes moles), fácil acompanhamento do pós-operatório radiograficamente.

A TTA também permite a avaliação mais fidedigna da consolidação óssea, devido a criação da falha óssea no trans-cirurgico. Além disso a criação da falha óssea diminui a possibilidade de osteomielite, sendo que nesse estudo a media de tempo cirurgico não foi longo (1hora e 12 minutos) (BRAGA et al., 2012; ARIAS et al., 2013).

Nesse estudo as radiografias foram feitas com a articulação femur-tibio-patelar em angulação de 135°, a qual permite a padronização entre os grupos, como preconizado por Kim et al. (2008) e Boudrueau (2007).

Utilizou-se da análise visual das radiografias para definir o tempo da consolidação óssea, sendo as imagens analisadas em estudo duplo cego por 2 radiologistas e um ortopedista. A avaliação radiográfica da consolidação óssea é de grande importância para saber o tempo exato da consolidação óssea (OROSZ, 2002). O método de análise visual já foi utilizado em vários estudos para avaliar a consolidação óssea e é considerada válida com grande concordância entre observadores (HOFFMANN *et al.*, 2006; BOUDRIEAU, 2007; ETCHEPAREBORDE *et al.*, 2011; SILVEIRA, 2013, ZAMARIAN, 2014; DANTES *et al.*, 2016).

Optou-se pela avaliação radiografica a cada 21 dias, mesmo sabendo que não se sabe exatamente o momento da consolidação óssea, sendo a médio do tempo de

consolidação óssea na TTA é de 60 a 120 dias (LAFEVER et al., 2007; BOUDRIEAU, 2011; SILVEIRA, 2013; MARQUES et al., 2017). Ocorrem poucas alterações radiográficas quando as radiografias são realizadas em intervalos menores de tempo (LAFEVER et al., 2007; GUERRERO et al., 2011, LANDE et al., 2012). Além disso, outros estudos já utilizaram o intervalo de 21 dias entre as radiografias (IBANEZ et al., 2003; MARQUES et al., 2017).

O grupo DN apresentou-se com o tempo de consolidação menor em comparação ao grupo controle. Outros estudos já mostraram os efeitos benéficos do DN para acelerar o processo de consolidação óssea (CUNHA et al., 2004; IBANEZ et al., 2003; MARQUES, 2017; SENOS et al., 2019). O uso de anabolizantes para consolidação óssea tem ganhado destaque nas últimas décadas, principalmente na medicina. O que está de acordo com GENNARI *et al.* (1989), PASSERI *et al.* (1993), AITHAL *et al.* (2009) e LEMOS *et al.* (2013).

O DN foi aplicado na dose de 2 mg/kg no 15º dia e depois a cada 21 dias, como preconizado por Ibañez et al. (2003) e Marques et al. (2017). O máximo de aplicações utilizada nesse presente estudo foi de 3 doses, sendo que mais da metade dos animais receberam somente duas doses do anabolizante. Devido as aplicações serem realizadas a cada 21 dias e o maior tempo de consolidação observado com o uso do DN foi de 63 dias, não necessitou de mais de 3 doses de DN.

Não se observou nenhum efeito colateral com o uso do DN, nem no grupo DN e nem CTDN. Por precaução, a cada 21 dias realizou-se exames complementares como hemograma e bioquímicos. Os efeitos adversos do uso dos análogos da testosterona (como o DN) está relacionado principalmente as formas de administração, principalmente dosagem e frequência de aplicação (BROWER, 2002). Ratos tratados com 15mg/kg de DN apresentaram alteração no comportamento social, deixando os animais mais isolados e mais agressivos (KOUVELAS et al., 2008). Tratamento com DN crônico interferiu na neurotransmissão glutamatérgica (ROSSBACH et al., 2007). Ratos tratados com 15mg/kg de DN semanalmente apresentaram hipertrofia concêntrica de ventrículo esquerdo (SOARES et al., 2011). Preconizou-se nesse trabalho o uso de dose baixa de DN e intervalo entre as aplicações de 21 dias. Não foram observadas alterações nos animais tratados, segundo questionário preenchido pelos tutores.

As TTAs foram realizadas em animais de rotina médica, portanto não realizou-se a histopatologia para acompanhar microscopicamente a consolidação óssea. Senos (2014) demonstrou aumento das células osteoblásticas e diminuição das osteoclásticas

em ratos com não união atrófica tratados com DN.

Como observado neste trabalho, uma grande vantagem no uso do DN para acelerar a consolidação óssea é o seu baixo custo, tendo sido mundialmente utilizado para o tratamento de osteoporose em seres humanos devido a sua viabilidade econômica (SENOS, 2014; ZAMARIAN, 2014). Além disso, não necessita de procedimento invasivo, pois o DN é utilizado por via intramuscular. Outro dado encontrado no presente trabalho foi o desenvolvimento de massa muscular dos animais que utilizaram a DN. Em humanos o DN é muito utilizado para o desenvolvimento de massa muscular (SOARES et al., 2011).

Em relação ao grupo CT apresentou-se estatisticamente menor o tempo de consolidação óssea quando comparado ao grupo controle, diferindo dos dados encontrados por Santos e colaboradores (2018) que não encontrou diferença em uso de CT na falha óssea criada pela TTA. Utilizou-se células-tronco derivadas de polpa dentária, aplicação após 15 dias do procedimento cirúrgico e aplicação a cada 21 dias até observação da consolidação óssea, diferindo de Santos e colaboradores (2018) onde utilizou-se células tronco derivadas de tecido adiposo, aplicação das CT após 8 dias pós-operatório e em dose única, respectivamente. Sabe-se que as células-tronco tem tropismo por tecido inflamado (microambiente da lesão interfere na ação das células-tronco) (EL-JAWHARI et al. 2016), com isso, optou-se aplicação 15 dias de pós-operatório no presente trabalho. Prado e colaboradores utilizaram células tronco em pacientes com hérnia de disco toracolombar no momento do procedimento cirúrgico e após 7 dias de pós-operatório, sem efeito benéfico na sua utilização.

Também optou-se pela aplicação das CT após 15 dias de pós-operatório para não ter influencia das CT com os fármacos utilizados no pós-operatório. Sabe-se que muitos antimicrobianos e anti-inflamatórios interferem na ação das CT (JAWHARI et al., 2016).

Optou-se pela aplicação das CT no local da falha óssea, para ter a maior concentração possível das CT na falha óssea, corroborando com a técnica utilizada por Santos e colaboradores (2018) em pacientes que realizaram TTA. Outros trabalhos já aplicaram células tronco em falhas ósseas (LIN et al., 2017; BRAGDON e BAHNEY, 2018; SANGHANI-KERAI et al., 2018; IAQUINTA et al., 2019; XU et al., 2020; SAFAROVA et al., 2020).

Para uma localização mais exata da falha óssea utilizou-se as imagens radiográficas e ecografia, diferindo de Santos et al. (2018), onde a falha óssea foi

localizada através da palpação do local cirúrgico.

Ainda o que é muito heterogeneo quando se fala de CT, é sua produção (desde local da coleta, método da coleta, processamento, transporte até o local das clínicas, formas de preservação). Nesse presente trabalho utilizou-se CT de polpa dentária, processadas no Setor de Anatomia da Universidade de São Paulo, onde as mesmas foram caracterizadas padronizadas. Sabe-se que ocorrem variações das CT em diferentes temperaturas (ISHKITIEV et al., 2010; JAWHARI et al., 2016), com isso, obteve-se por levar as CT da Universidade de São Paulo (USP) até a Faculdade Anclivepa, em isopor com gelo e o transporte o mais rápido possível, assim como a sua aplicação. Somente dois pacientes apresentaram eritema e prurido no local de aplicação das células tronco, isso provavelmente ocorreu devido a sensibilidade individual de cada paciente e sabe-se que essas reações podem ocorrer após a aplicação de qualquer fármaco (JAWHARI et al., 2016). Essas alterações ocorreram por 2 dias após a aplicação, não sendo necessário a utilização de fármacos para o tratamento.

Utilizou-se células tronco de polpa dentária devido ao seu fácil acesso no setor de Anatomia Veterinária da USP. Além disso, sabe-se que células tronco de polpa dentária induzem regeneração óssea, fácil cultivo em laboratório, não invasivo para coleta do material (lentes decíduas), como observado em trabalhos (GRONTHOS et al., 2000; Miura et al., 2003; PORTDAR; JETHMALANI, 2015; PRADO et al., 2019).

Para prevenir infecção e desenvolvimento de osteomielite, a aplicação das CT foram realizadas com luvas estereis, gorro, mascara e dentro do centro cirúrgico.

O grupo que apresentou o menor tempo de consolidação óssea foi CTDN, a qual associou-se as células tronco com decanoato de nandrolona. O tempo de consolidação óssea da osteotomia foi significativamente menor quando comparado aos outros grupos. Relatos *in vitro* mostra o aumento da proliferação das células tronco quando ficam em contato com a testosterona (COROTCHI et al., 2016; RIBEIRO et al., 2014). O DN é um análogo da testosterona.

Pode-se dizer que a associação de CT e DN apresentaram sinergia para a consolidação da falha óssea de pacientes que realizaram TTA. Além disso, não observou-se efeitos colaterais em sua associação. Não observou-se a formação de neoplasia em nenhum dos pacientes desse estudo, sendo que todos foram acompanhados até 11 meses do procedimento cirúrgico através de telefonemas e whatsapp.

Não podemos deixar de citar que, a osteotomia criada na TTA é local de osso esponjoso, isto é, com potencial de consolidação maior que a diáfise óssea. Portanto

novos estudos devem ser realizados para saber em osso cortical para saber se ocorrerá o mesmo benefício encontrado na sua utilização em pacientes que realizara TTA. Quanto maior o número de modalidades para obter-se a consolidação óssea, melhor será para os pacientes.

As CT podem ser aplicadas em local de falha óssea guiadas pela ecografia ou radiografia e a utilização do DN por via intramuscular. Isso é procedimentos de pouca invasibilidade. Lembrando que nenhum dos nossos pacientes precisaram ser sedados para aplicação das células tronco, devido ao baixo grau de dor na sua aplicação.

8 CONCLUSÃO

Concluiu-se com o presente estudo:

1. A associação de células-tronco de polpa dentária com decanoato de nandrolona acelerou o processo de consolidação óssea da falha óssea criada após a realização da técnica de TTA.
2. Em relação ao uso somente das células-tronco polpa dentária pode-se concluir que proporcionou melhor tempo de consolidação da TTA em relação ao grupo controle.
3. O uso de decanoato de nandrolona diminuiu o tempo de consolidação óssea.
4. A TTA apresentou resultados benéficos para o estudo de osteogênese em cães.
5. Não observou-se grandes complicações com a administração de CT na osteotomia criada pela TTA.
6. Não observou-se complicações com o uso de DN por via intra-muscular em cães saudáveis, com os intervalos e doses utilizadas no trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELAZ, P.; ELZOGHBI, A.; SHOKRY, M.; AHME, A. RASHA, H. Reparative dentin formation using stem cell therapy versus calcium hydroxide in direct pulp capping: An animal study. **Brazilian Dental Journal**, v. 30, n. 6, p. 542-549, 2019.

AHMAD, F.; YUNUS, S. M., ASGHAR, A.; FARUQI, N. A. Influence of anabolic steroid on tibial fracture healing in rabbits - a study on experimental model. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 1, p. 93–96, 2013.

AITHAL, H. P.; KINJAVDEKAR, P.; AMARPAL PAWDE, A M.; SINGH, G. R.; PATTANAİK, A K.; SETIA, H. C. Effects of Nandrolone and TGF-beta1 in growing rabbits with osteopenia induced by over-supplementation of calcium and vitamin D3. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 4, p. 331– 43, 2009.

ALGE, D. L.; ZHOU, D.; ADAMS, L. L.; WYSS, B. K.; SHADDAY, M. D.; WOODS, E. J.; GABRIEL, C. T. M.; GOEBEL, W. S. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. **Journal Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 73–81, 2010.

ANITUA, E.; TROYA, M.; ZALDUENDO, M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytherapy*. **Elsevier Inc.** v. 20, n. 4, p. 479, 2018.

ARANA M.; MAZO, M.; ARANDA, P.; PELACHO, B.; PROSPER, F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization. **Methods in Molecular Biology**, v.1036, p.47–61, 2013.

ARIAS, M. V. B.; AIELLO, G.; BATTAGLIA, L. A.; FREITAS, J. C. Estudo da ocorrência de infecção hospitalar em cães e gatos em um centro cirúrgico veterinário universitário. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 771-779, 2013.

ARTHUR, A.; RYCHKOV, G.; SHI, S.; KOBLAR, S. A.; GRONTHOS, S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. **Stem Cells**, v. 26, n. 7, p. 1787– 1795, 2008.

AZIZI, S. A.; STOKES, D.; AUGELLI, B. J.; DIGIROLAMO, C.; PROCKOP, D. J. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 7, p. 3908-3913, 1998.

BACURAU, R. F.; NAVARRO, F.; UCHIDA, M. C. **Hipertrofia-hiperplasia: fisiologia, nutrição e treinamento do crescimento muscular**. São Paulo: Phorte Editora, 2001.

BAHRKE, M.S.; YESALIS, C.E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. **Current Opinion in Pharmacology**, v.6, n.4, p.614-620, 2004.

BANAS, A.; TERATANI, T.; YAMAMOTO, Y.; TOKUHARA, M.; TAKESHITA, F.; QUINN, G.; OKOCHI, H.; OCHIYA, T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 219–228, 2007.

BARRÉRE, F.; BLITTERSWIJK, C. A. VAN; GROOT, K. D. E. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. **Internation Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 317 – 332, 2006

BARROS, S. V. S.; DEL CARLO, R. J.; VILORIA, M. I.; GALVÃO, S. R.; FILHO, A. M.; OLIVEIRA, D. R. Auto - enxerto percutâneo de medula óssea II. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 627-632, 2001.

BERIASHVILI, G. K.; MENABDE, G. K.; CHIKHLADZE, R. T. Morphological peculiarities of consolidation of experimental mandible fractures by osteosynthesis using kollapan and retabolil. **Georgian Medical News**, v. 136, p. 105-108, 2006.

BRAGDON, C. C.; BAHNEY, C. S. Origin of reparative Stem Cells in Fracture Healing. **Current osteoporosis reports**, v. 16, n. 4, p. 490-503, 2018.

BRAGA, D. P.; BORGES, A. P. B.; CARVALHO, T. B.; SANTOS, L. C.; CORSINI, C. M. M. Antibiocoprolaxia em cirurgias de cães e gatos: necessidade e realidade. **Revista Ceres**, v. 59, n. 6, p. 758-764, 2012.

BISGARD, S. K.; BARNHART, M. D.; SHIROMA, J. T.; KENNEDY, S. C.; SCHERTEL, E. R. The effect of cancellous autograft and novel plate design on radiographic healing and postoperative complications in tibial tuberosity advancement for cranial cruciate deficient canine stifles. **Veterinary Surgery**, v. 40, n. 4, p. 402-407, 2011.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

BOUDRIEAU, R. J. Tibial tuberosity advancement for stabilization of the canine cranial cruciate ligament deficient stifle joint: surgical technique, early results, and complication in 101 dogs. **Veterinary Sugery**, v. 36, p. 573-586, 2007.

BOUDRIEAU, R.J. Letter to the Editor: Bone grafting and tibial tuberosity advancement. **Veterinary Sugery**, v.40, p.641-643, 2011.

BROULÍK, P.D.; BROLULÍKOVÁ, K. Raloxifen prevents bone loss in castrated male mice. **Physiological Research**, v. 56, p. 443-447, 2007.

BROWER, K. L. Anabolic steroid abuse and dependence. **Current Psychiatry Reports**, v. 4, p. 377-387, 2002.

BUENO, D. F. Bone Tissue Engineering With Dental Pulp Stem Cells for Alveolar

Cleft Repair - **Full Text View - ClinicalTrials.gov**. Hospital Sirio-Libanês; 2018.

CALLEWAERT, F.; BOONEN S.; VANDERSCHUEREN, D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 2, p. 89-95, 2010.

CARDOZO, C. P.; QIN, W.; PENG, Y.; LIU, X.; WU, Y.; PAN, J.; BAUMAN, W. A.; ZAIDI, M.; SUN, L. Nandrolone slows hindlimb bone loss in a rat model of bone loss due to denervation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 303-306, 2010.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.

CHOUDHERY, M.S.; BADOWSKI, M.; MUISE, A.; PIERCE, J.; HARRIS, D.T. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. **Journal Translational Medicine**, v.12, p.8, 2014.

COROTCHI, M.C.; POPA, A.M.; SIMIONESCU, M. Testosterone stimulates proliferation and preserves stemness of human adult mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v.57, n.1,p.75–80, 2016.

CUNHA, T. S.; CUNHA, N. S.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 165-179, 2004.

DAI, J.; WANG, J.; LU, J.; ZOU, D.; SUN, H.; DONG, Y.; YU, H.; ZHANG, L.; YANG, T.; ZHANG, Z.; WANG, X.; SHEN, G. The effect of co-culturing costal chondrocytes and dental pulp stem cells combined with exogenous FGF9 protein on chondrogenesis and ossification in engineered cartilage. **Biomaterials. Netherlands**, v. 33, n. 31, p. 7699-7711, 2012.

DALLE CARBONARE, L.; VALENTI, M.T.; BERTOLDO, F.; ZANATTA, M.; ZENARI, S.; REALDI, G.; LO CASCIO, V.; GIANNINI, S. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Micron**, v. 36, n. 7-8, p. 609-616, 2005.

DANTAS, T.S.; LELIS, E.R.; NAVES, L.Z.; NETO-FERNANDES, A.J.; MAGALHÃES, D. Materiais de Enxerto Ósseo e suas Aplicações na Odontologia. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.12, n.2, p.131-135, 2011.

DANTES, B. L.; SUL, R.; PARKIN, T.; CALVO, I. Incidence of complications associated with tibial tuberosity advancement in Boxer dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 29, n.1, p. 39-45, 2016.

DAVE, J. R.; TOMAR, G. B. Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Applications in Tissue Engineering. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 46, n. 5, p. 429-468, 2018.

DAVIES, H. T.; NUTLEY, S. M. Developing learning organisations in the new NHS. **British Medical Journal**, v. 8, n. 320, p. 998-1001, 2000.

DI MAMBRO A.; FERLIN A.; DE TONI, L.; SELICE, R.; CARETTA, N.; FORESTA, C. Endothelial progenitor cells as a new cardio-vascular risk factor in Klinefelter's syndrome. **Molecular Human Reproduction**, v.16, n.6, p.411-417, 2010.

DISSANAYAKA, W. L.; ZHU, X.; ZHANG, C.; JIN, L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. **JOURNAL OF ENDODONTICS**, v. 37, n. 8, p. 1074-1080, 2011.

DUTRA, B. S. C.; PAGANI, M. M.; RAGNINI, M. P. Esteróides Anabolizantes: uma abordagem teórica. **Revista Da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 3, n.2, p.21-39, 2012.

DUVAL, J. M.; BUDSBERG, S. C.; FLO, G. L.; SAMMARCO, J. L. Breed, sex, and body weight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 215, p. 811-814, 1999.

EDWARDS, J.R.; MUNDY, G.R. Advances in OC biology: old findings and new insights from mouse models. **Nature Reviews Rheumatology**, v.7, n.4, p.235-243, 2011.

EL-JAWHARI, J.; SANJURJO-RODRÍGUEZ, C.; JONES, E.; GIANNOUDIS, P. Collagen-containing scaffolds enhance attachment and proliferation of non-cultured bone marrow multipotential stromal cells. **Journal Orthopaedic research**, v. 34, n. 4, p. 596-606, 2016.

ETCHEPAREBORDE, S.; BRUNEL, L.; BOLLEN, G.; BALLIGAND, M. Preliminary experience of a modified Maquet technique for repair of cranial cruciate ligament rupture in dogs. **Veterinary Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 24, n. 3, p. 223-227, 2011.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I.; ALOBERA-GRACIA, M. A.; DEL-CANTO-PINGARRÓN, M.; BLANCO-JEREZ, L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. **Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal**, v. 11, n. 2, p. 151-157, 2006.

FERNANDES, T. L.; SANTANNA, J.; FRISENE, I.; GASARINI, J.; PINHEIRO, C. C. G.; GOMOLL, A. H.; LATTERMANN, C.; HERNANDEZ, A. J.; BUENO, D. F. Systematic review of human dental pulp stem cells for cartilage regeneration. Tissue engineering part B. **Reviews**, v. 26, n. 1, p. 1-12, 2020.

FUSATTO, E. D. L. Efeito da nandrolona em músculo esquelético imobilizado. **Saúde em Revista**, v. 13, n. 33, p. 77–79, 2010.

FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; JOHNSON, A. L.; SEIM, H. B.; WILLARD, M. D.; BAHR, A.; CARROLL, G. L. (2007). **Small Animal Surgery**. (Third Edition). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.

FRISOLI-JUNIOR, A. **Osteoporose no idoso e fraturas de quadril**. In: BORGES, Durval Rosa (coord). *Atualização terapêutica de Prado, Ramos e Valle: diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Artes Médicas, p. 535-536, 2012.

GAO, W.; BOHL, C. E.; DALON, J. T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 9, p. 3352-3370, 2005.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. T. **Tratado de Histologia em cores**. 3. Ed. Rop de Janeiro: Elsevier, 2007.

GENNARI, C.; AGNUSDEI, D.; GONNELI, S.; NARDI, P. Effects of nandrolone decanoate therapy on bone mass and calciu metabolism in women with established post-menopausal osteoporosis: a doubçe-blind placebo-controlled study. **Maturitas**, v. 11, n. 3, p. 187–197, 1989.

GIANNOUDIS, P.; PSARAKIS, S.; KONTAKIS, G. Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. **Injury**, v. 38, n. 1, p. 81–89, 2007.

GOLHAHN, J.; LITTLE, D.; MITCHELL, P.; FAZZALARI, N. L.; REID, I. R.; ASPENBERG, P.; MARSH, D. Evidence for anti-osteoporosis therapy in acute fracture situations- Recommendations of a multidisciplinary workdhop of the Internation Society for Fracture Repair. **Bone**, v. 46, n. 2, p. 267-271, 2010.

GRAZIANO, A.; D' AQUINO, R.; PAPACCIO, G.; LAINO, G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. **Stem Cell**, v. 4, n. 1, p. 21-26, 2008.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States America**, v. 97, n. 25, p. 13625–13630, 2000.

GUYTON, H.; HALL, J.E. **Os hormonios anabolizantes**. *Tratamento de Fisiologia Médica*, Rio de Janeiro, Ganabara Koogan, 2002, Cap. 73.

HARADA, S.; RODAN, G.A. Control of OB function and regulation of bone mass. **Nature**, v.423, p.349–355, 2003.

HEDSTRÖM, M.; SJÖBERG, K.; BRO SJÖ, E.; ASTROM, K.; SJÖBERG, H.; DALEN, N. Positive effects of anabolic steroid, vitamin D and calcium on muscle mass, bone mineral density and clinical function after a hip fracture. A randomised study of 63

women. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 84, n. 4, p. 497-503, 2002.

HOFBAUER, L. C.; KHOSLA, S. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. **European Journal of Endocrinology**, v. 140, n. 4, p. 271-286, 1999.

HOFFMANN, D. E.; MILLER, J. M.; OBER, C. P.; LANZ, O. I.; MARTIN, R. A.; SHIRES, P. K. Tibial tuberosity advancement in 65 canine stifles. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 29, n. 4, p. 219-227, 2006.

HUANG, A. H.; SNYDER, B.; CHENG, P.; CHAN, A. W. S. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. **Stem Cells**, v. 26, n. 10, p. 2654-2663, 2008.

HUANG, C.K.; LEE, S.O.; LAI, K.P.; MA, W.L.; LIN, T.H.; TSAI, M.Y.; LUO, J.; CHANG, C. Targeting androgen receptor in bone marrow mesenchymal stem cells leads to better transplantation therapy efficacy in liver cirrhosis. **Hepatology**, v.57, n. 4, p.1550–1563, 2013a.

HUANG, C.K.; TSAI, M.Y.; LUO, J.; KANG, H.Y.; LEE, S.O.; CHANG, C. Suppression of androgen receptor enhances the self-renewal of mesenchymal stem cells through elevated expression of EGFR. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1833, n.5, p.1222–1234, 2013b.

IAQUINTA, M. R.; MOZZONI, E.; BONONI, I.; ROTONDO, J. C.; MAZZIOTTA, C.; MONTESI, M.; SPRIO, S.; TEMPIERI, A.; TOGNON, M.; MARTINI, F. Adult Stem cells for bone regeneration and repair. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, p. 268, 2019.

IBANEZ, J.F.; SILVA, T.S.; PONTES, D.R. Uso de decanoato de nandrolona (Decadurabolin) como estimulante da proliferação óssea em cães com consolidação retardada. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.40, p. 229-230, 2003.

ISHIKITIEV, N.; YAEGAKI, K.; CALENIC, B.; NAKAHARA, T.; ISHIKAWA, H.; MITIEV, V.; HAAPASALO, M. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. **Journal of endodontics**, v. 36, n. 3, p. 469-474, 2010.

JACKSON, D.A. **Tratamento das fraturas umerais**. In: BOJERAB, M. J. (Ed.) *Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais*. 3a ed., Roca, São Paulo, p. 710-724, 2005.

JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E.; CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. **Journal Cellular Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 295–312, 1997.

JEONG, S. Y.; LEE, S.; CHOI, W. H.; JEE, J. H.; KIM, H. H.; YOO, J. Fabrication of Dentin-Pulp-Like Organoids Using Dental-Pulp Stem Cells. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 641-653, 2020.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B. N.; REINHARDT, R. L.; SCHWARTZ, R. E.; KEENE, C. D.; ORTIZ-GONZALEZ, X. R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W. C.; LARGAESPADA, D. A.; VERFAILLIE, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, p. 41–49, 2002.

JONES, B. J.; MCTAGGAR, S. J. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 6, p. 733–741, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____ **Histologia Básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 135–152.

JURGENS, W.J.; OEDAYRAJSINGH-VARMA, M.J.; HELDER, M.N.; ZANDIEHDOULABI, B.; SCHOUTEN, T.E.; KUIK, D.J.; RITT, M.J.; VAN MILLIGEN, F.J. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Cell and Tissue Research**, v.332, n.3, p.415–426, 2008.

KALFAS, I. H. Principles of bone healing. **Neurosurgical Focus**, v. 10, n. 4, p. 1-4, 2001.

KAPLANSKIÄ, A. S.; DURNOVA, G. N. Role of insufficient hormone production in development of osteopenia in consequence of physical loads deficiency. **Aviakosmicheskaya Ekologicheskaya Meditsina**, v. 41, n. 6, p. 13-7, 2007.

KASPERK, C. H.; WAKLEY, G. K.; HIERL, T.; ZIEGLER, R. Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*. **The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 3, p. 464–471, 1997.

KATCHBURIAN,E.;ARANA,V.Histologia e Embriologia Oral /Textos **-Atlas-Correlações Clínicas**.2 a .São Paulo:Guanabara Koogan,2004

KERAMARIS, N. C.; CALORI, G. M.; NIKOLAOU, V. S.; SCHEMITSCH, E. H.; GIANNOUDIS, P. V.). Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. **Injury**, v. 39, n.2, p. 45–57, 2008.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 1294–1301, 2006.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLUTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1294–1301, 2006.

KERKIS, I.; CAPLAN, A. I. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 18, n. 2, p. 129-138, 2012.

KIM, S. E.; POZZI, A.; KOWALESKI, M. P.; LEWIS, D. D. Tibial osteotomies for cranial cruciate ligament insuffi cient in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 2, p. 111-125, 2008.

KOLAR, P.; SCHMIDT-BLEEK, K. P. H, D.; SCHELL, H.; GABER, T.; TOBEN, D.; SCHMIDMAIER, G.; PERKA, C.; BUTTGEREIT, F.; DUDA, G. N. The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing. **Tissue Engineering: Part B**, v.16, n. 4, p. 427–434, 2010.

KOMADA, Y.; YAMANE, T.; KADOTA, D.; ISONO, K.; TAKAKURA, N.; HAYASHI, S.; YAMAZAKI, H. Origins and properties of dental, thymic, and bone marrow mesenchymal cells and their stem cells. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 46436, 2012.

KOUVELAS, D.; POURZITAKI, C.; PAPAISIS, G.; DAGKLIS, T.; DIMOU, K.; KRAUS, M. M. Nandrolone abuse decreases anxiety and impairs in rats via central androgenic receptores. **International Journal Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 7, p. 925-934, 2008.

KUHN, C. M. Anabolic steroids. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 411–434, 2002.

LACEY, D.L.; BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; KOSTENUIK, P.J.; DOUGALL, W.C.; SULLIVAN, J.K.; SAN MARTIN, J.; DANSEY, R. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 5, p. 401–419, 2012.

LAFEVER, S.; MILLER, N. A.; STUBBS, W. P.; TAYLOR, R. A.; BOUDRIEAU, R. J. Tibial tuberosity advancement for stabilization of the canine cranial cruciate ligament deficient stifle joint: surgical technique, early results, and complication in 101 dogs. **Veterinary Sugery**, v. 36, n. 6, p. 573-586, 2007.

LANDE, R. G.; WORTH, A. J.; GUERRERO, T. G.; OWEN, M. C.; HARTMAN, A. Comparison between a novel bovine xenoinplant and autogenous cancellous bone graft in tibial tuberosity advancement. **Veterinary Surgery**, v. 41, n. 5, p. 559-567, 2012.

LEDESMA-MARTÍNEZ, E.; NÚÑEZ-MENDOZA, V. M.; OSORIO-SANTIAGO, E.; Mesenchymal Stem Cells Derived from Dentl Pulp: A review. *Stem Cells International*, v. 2016, n. 1, p. 1-12, 2016.

LEE, K.; KIM, H.; KIM, J.M.; KIM, J.R.; KIM, K.J.; KIM, Y.J.; PARK, S.I.; JEONG, J.H.; MOON, Y.M.; LIM, H.S.; BAE, D.W.; KWON, J.; KO, C.Y.; KIM, H.S.; SHIN, H.I.; JEONG, D. Systemic transplantation of human adipose-derived stem cells stimulates bone repair by promoting osteoblast and osteoclast function. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.15, n.10, p.2082–94, 2011.

LEE, K. B. L.; HUI, J. H. P.; SONG, I. C.; ARDANY, L.; LEE, E. H. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2964-2971, 2006.

LEE, S.; ZHANG, X.; SHEN, J.; JAMES, A. W.; CHUNG, C. G.; HARDY, R.; LI, C.; GIRGIUS, C.; ZHANG, Y.; STOKER, D.; WANG, H.; BENJAMIN, M. W.; PEULT, B. Brief Report: Human Perivascular Stem Cells and Nel-Like Protein-1 Synergistically Enhance Spinal Fusion in Osteoporotic Rats. **Stem Cells**, v. 33, n. 10, p. 3158–3163, 2015.

LEMOS, M. P.; NAKAOKA, V. Y. E. S.; KASHIWABARA, T. G. B. Osteoporose no idoso e fraturas de quadril. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 4, n. 3, p. 45-48, 2013.

LEYENDECKER JUNIOR, A.; GOMES PINHEIRO, C. C.; LAZZARETTI FERNANDES, T.; FRANCO BUENO, D. The use of human dental pulp stem cells for in vivo bone tissue engineering: A systematic review. **Journal Tissue Engineering**, v. 9, p. 1-18, 2018.

LIANG, X.; GLOWACKI, J.; HAHNE, J.; XIE, L.; LEBOFF, M. S.; ZHOU, S. Dehydroepiandrosterone stimulation of osteoblastogenesis in human MSCs requires IGF-I signaling. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 8, p. 1769-1774, 2016.

LIAO, C.H.; WU Y.N.; LIN, F.Y.; TSAI W.K.; LIU S.P.; CHIANG H.S. Testosterone replacement therapy can increase circulating endothelial progenitor cell number in men with late onset hypogonadism. **Andrology**, v.1, n.4, p.563-569, 2013.

LIEBERHERR, M.; GROSSE, B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive g-protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7217-7223, 1996.

LIMA, S. A. F.; WODEWOTZKY, T. I.; LIMA-NETO, J. F.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; ALVARENGA, F. C. L. Diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 463-469, 2012.

LIN, W.; XU, L.; ZWINGENBERGER, S.; GIBON, E.; GOODMAN, S. B.; LI, G. Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 9, n. 1, p. 19-27, 2017.

MARQUES, D. R. C.; IBAÑEZ, J. F.; FREITAS, I. B. HESPANHA, A. C.; MONTEIRO, J. F.; EGGERT, M. BECKER, A. Effects of nandrolone decanoate on time to consolidation of bone defects resulting from osteotomy for tibial tuberosity advancement. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 30, n. 5, p. 351-356, 2017.

MARTINEZ, S. A; MILLIS, D. L. **Bone grafts**. In: SLATTER, D. Textbook of Small Animal Surgery. 3.ed. Philadelphia: Saunders, p. 1875-1891, 2003.

MELLONI, R. H. JR.; CONNOR, D. F.; XUAN HANG, P. T.; HARRISON, R. J.; FRRIS, C. F. Anabolic-androgenic steroid exposure during adolescence and aggressive behavior in Golden hamsters. **Physiology and Behavior**, v. 61, p. 359- 364, 1997.

MENDONÇA COSTA, A.; BUENO, D. F.; MARTINS, M. T.; KERKIS, I.; KERKIS, A.; FANGANIELLO R. D.; CERRUTI, H.; ALONSO, N.; PASSOS-BUENO, M. R. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. **Journal Craniofacial Surgery**, v. 19, n. 1, p. 204-210, 2008.

MIRSAIDI, A.; GENELIN, K.; VETSCH, J.R.; STANGER, S.; THEISS, F.; LINDTNER, R.A.; VON RECHENBERG, B.; BLAUTH, M.; MULLER, R.; KUHN, G.A.; HOFMANN BOSS, S.; EBNER, H.L.; RICHARDS, P.J. Therapeutic potential of adipose-derived stromal cells in age-related osteoporosis. **Biomaterials**, v. 35, n. 26, p. 7326–35, 2014.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **PNAS**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, 2003.

MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. **Bone growth factors**. Clinical Orthopaedics, Philadelphia, v. 263, p. 30-48, 1991.loure

MOTA, F. D. C.; REBELLATO, K. R.; MORAES, A. C.; OKUBO, R.; BELO, M. A. A.; EURIDES, D. Análise das propriedades mecânicas da tíbia de ratos submetida à osteotomia por escareação e tratada com decanoato de nandrolona. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 3, n. 6, p. 57–59, 2010.

NAITO, E.; KUDO, D.; SEKIME, S. WATANABE, K.; KOBATAKE, Y.; TAMAOKI, N.; INDEN, M. IIDA, K.; ITO, Y.; HOZUMI, I.; SHIBATA, T.; MAEDA, S.; KAMISHINA, H. Characterization of canine dental pulp cells and their neuroregenerative potential. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 51, n. 10, p. 1012-1022, 2015.

NOSRAT, I. V.; WIDENFALK, J.; OLSON, L.; NOSRAT, C. A. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. **Developmental Biology**, v.238, n. 1, p. 120–132, 2001.

NOSRAT, I. V.; SMITH, C. A.; MULLALLY, P.; OLSON, L.; NOSRAT, C. A. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 9, p. 2388-2398, 2004.

NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. **Fertility and Sterility**, v. 77, n. 4, p. 34-41, 2002.

OROSZ, S.E. Clinical considerations of the thoracic limb. **Veterinary Clinical North American Exotic Animal Practic**, v.5, n.1, p.31-48, 2002.

PALERMO-NETO, J. **Anabolizantes**. In: SPINOSA, H. S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. Farmacologia aplicada a medicina veterinária. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 528.

PARDI, A. C. R. **Ação da nandrolona no padrão energético do músculo esquelético imobilizado: Estudo em ratos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Faculdade de ciências da saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2010.

PARK, Y. B.; HA, C. W.; KIM, J. A.; HAN, W. J.; RHIM, J. H.; LEE, H. J.; KIM, K> J.; PARK, Y. G.; CHUNG, J. Y.. Single-stage cell-based cartilage repair in a rabbit model: cell tracking and in vivo chondrogenesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid hydrogel composite. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, n. 4, p. 570-580, 2017.

PASSERI, M.; PEDRAZZONI, M.; PIOLI, G.; BUTTURINI, L.; RUYS, A. H.; CORTENRAAD, M. G. Effects of nandrolone decanoate on bone mass in established osteoporosis. **Maturitas**, v. 17, n. 3, p. 211–219, 1993.

PÉREZ-SÁNCHEZ, M. J. et al. Biomaterials for bone regeneration. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 15, n. 3, p. 517-22, 2010.

PERRY, B. C.; ZHOU, D.; WU, X.; YANG, F. C.; BYERS, M. A.; CHU, T. M.; HOICHEMA, J. J.; WOODS, E. J.; GOEBEL, W. S. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. **Tissue Engineering Part C**, v. 14, n. 2, p. 146-156, 2008.

PHILLIPS, A. M. Overview of the fracture healing cascade. **Injury**, v. 36, n. 3, p. 5–7, 2005.

PIERDOMENICO, L.; BONSI, L.; CALVITTI, M.; RONDELLI, D.; ARPINATI, M.; CHIRUMBOLO, G.; BECCHETTI, E.; MARCHIONNI, C.; ALVIANO, F.; FOSSATI, V.; STAFFOLANI, N.; FRANCHINA, M.; GROSSI, A.; BAGNARA, G. P. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 80, n. 6, p. 836-842, 2005.

PINTO FILHO, S. T. L.; TREICHEL, T. L. E.; ARAMBURÚ JUNIOR, J. S.; ROSA, M. B.; DALMOLIN, F.; BRUN, M. V.; KRAUSE, A.; PIPPI, N. L. Células-tronco mesenquimais adultas: Características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 49-59, 2013.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999.

PLACENCIO, V.R.; LI, X.; SHERRILL, T.P.; FRITZ G.; BHOWMICK, N.A. Bone marrow derived mesenchymal stem cells incorporate into the prostate during regrowth. **Plos One**, v. 5, n. 9, p. 12920, 2010.

PORTDAR, P. D.; JETHMALANI, Y. D. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. **World Journal Stem Cells**, v. 7, n. 5, p. 839-851, 2015.

PRADO, C.; FRATINI, P.; MATIAS, G. S.; BOCABELLO, R.; MONTEIRO, J.; JIMIOR-SANTOS, C. J.; JOAQUIM, J. G. F.; GIGLIO, R. F.; POSSEBOM, F. S.; SAKATA, S. H.; MIGLINO, M. A. Combination of stem cells from deciduous teeth and electroacupuncture for therapy in dogs with chronic spinal cord injury: A pilot study. **Research in Veterinary Science**, v. 123, n. 1, p. 247-251, 2019.

REYES, M.; VERFAILLIE, C. M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 938, n. 1, p. 231–233, 2001.

RIBEIRO, B. G.; FERNANDES, K. P. S.; SILVA, M. K. Sierra, S. O.; BUSSADORI, S. K.; FERRARI, R. A. M. Influência do anabolizante decanoato de nandrolona sobre a viabilidade de células satélites musculares em processo de diferenciação. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 21, n.1, São Paulo Jan./Mar. 2014

ROSSBACH, U. L.; STEENSLAND, P.; NYBERG, F.; LE GREVÉS, P. Nandrolone-induced hippocamp phosphorylation of NMDA receptor subunits and ERKs. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 357, n. 4, p. 1028-1033, 2007.

ROZEN, N.; LEWINSON, D.; BICK, T.; MERETYK, S.; SOUDRY, M. Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 17, n. 3, p. 197–213, 2007.

SAFAROVA, Y.; UMBAYEV, B.; HORTELANO, G.; ASKAROVA, S. Mesenchymal stem cells modifications for enhanced bone targeting and bone regeneration. **Regenerative Medicine**, v. 15, n. 4, p. 1579-1594, 2020.

SANGHANI-KERAI, A.; MCCREARY, D.; LANCASHIRE, H.; OSAGIO, L.;

COATHUP, M.; BLUNN, G. Stem Cell Interventions for bone healing: Fractures and osteoporosis. **Current Stem Cell Research and Therapy**, v. 13, n. 5, p. 369-377, 2018.

SANTOS, C. R. FIGUEIRAS, R. R.; MALARD, P. F.; BARRETO-VIANNA, A. R. C.; NOGUEIRA, K.; LEITE, C. S.; LIMA, E. M. M. Mesenchymal stem cells in osteotomy repair after tibial tuberosity advancement in dogs with cranial cruciate ligament injury. **Journal of Experimental Orthopaedics**, v. 5, n. 17, p. 1-8, 2018.

SARAIVA, G. L.; CASTRO-LAZARETTI, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação óssea na Prática Clínica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabologia**, v. 46, n.1, p. 72-78, 2002.

SATUÉ, M.; SCHÜLER, C.; GINNER, N.; ERBEN, R. G. Intra-articularly injected mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration, but do not permanently engraft in distant organs. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1 2019.

SCHALCH, T. D.; FERRARI, R. A. M.; SOUZA, N. H. C.; ALBARELLO, P. M.; FRANÇA, C. M.; BUSSADORI, S. K.; MARTINS, M. D.; FERNANDES, K. P. S. Effect of steroid nandrolone decanoate on osteoblast- like cells. **Medica Science and Technology**, v. 54, p. 107–111, 2013.

SCHINDELER, A.; MCDONALD, M. M.; BOKKO, P. LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Seminars Cell and Developmental Biology**, v. 19, n. 5, p. 459-466, 2008.

SENOS R. **Uso de decanoato de nandrolona na não-união de fratura induzida em fêmur de rato: aspectos morfológicos**. 2014. 88 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SENOS, R.; ROBERTO-RODRIGUES, M.; FERNANDES, R. M. P.; SANTOS, T. M. P.; VIANA, L. P.; LIMA, I.; GUZMAN-SILVA, M. A.; GOMES, M. S.; RICCI, R. E. G.; KFOURY JUNIOR, J. R. Nandrolone decanoate in induced fracture nonunion with vascular deficit in rat model: morphological aspects. **Musculoskeletal Surgery**, v. 13, n. 50, p. 1-9, 2019.

SIQUEIRA, V.J.; BERNIS, W.O.; SILVA, C.H.R.A.; SOARES, T.M.P.; FERREIRA, P.A.S.; CAMPOS, R.G.M. Correção cirúrgica de fratura de tíbia e fíbula em um leão (Panthera leo), por meio de pinos intramedulares de Steinmann: relato de caso. **Veterinária Notícia**, v. 7, p. 107-12, 2001.

SHAHIDI N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clinical Therapeutics**, v. 23, n. 9, p. 1355-1390, 2001.

SILVEIRA, F.R. **Comparação da utilização exclusiva de osso esponjoso autólogo com a utilização mista de osso esponjoso autólogo e fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) na cicatrização do espaço criado pela osteotomia realizada na técnica de tibial tuberosity advancement (TTA)**. 2013. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal, p.73, 2013.

SAKAI, K.; YAMAMOTO, A.; MATSUBARA, K.; NAKAMURA, S.; NARUSE, M.; YAMAGATA, M.; SAKAMOTO, K.; TAUCHI, R.; WAKAO, N.; IMAGAMA, S.; HIBI, H.; KADOMATSU, K.; ISHIGURO, N.; UEDA, M. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, p. 80-90, 2012.

SMITH, B. Viewpoints in surgery cruciate ligament rupture, extracapsular stabilization. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 6, p. 382-383, 2000.

SOARES, M. C. R. ABREU, I. C.; ASSENÇO, F.; BORGES, M. O. R. Decanoato de nandrolona aumenta a parede ventricular esquerda, mas atenua o aumento da cabidade provocada pelo treinamento de natação em ratos. **Revista Brasileira Médica Esportiva**, v. 17, n. 6, p. 420-424, 2011

STREM, B.M.; HICOK, K.C.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; SCHREIBER, R.E.; FRASER, J.K.; HEDRICK, M.H. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **The Keio Journal Medicine**, v. 54, n. 3, p. 132–41, 2005.

SWERDLOW, A.J.; HIGGINS, C.D.; SCHOMAKER, M.J.; WRIGHT, A.F.; JACOBS, P.A. United Kingdom Clinical Cytogenetics Group. Mortality in patients with Klinefelter syndrome in Britain: a cohort study. **Journal Clinical Endocrinol Metabolism**, v. 90, n. 12, p. 6516– 6522, 2005.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cells**, v. 131, n. 5, p. 861–72, 2007.

TAVARES, F. A. G.; SUFFREDINI, T. S.; OLIVEIRA, C. E. S.; BIAGINI, A. P.; OLIVEIRA, N. M. L. Atuação dos esteróides anabolizantes na regeneração músculo-esquelética. **Arquivo de Ciência e Saúde**, v. 15, n. 3, p. 145-149, 2008.

TENGSTRAND, B.; CEDERHOLM, T.; SÖDERQVIST, A.; TIDERMAR, J. Effects of protein-rich supplementation and nandrolone on bone tissue after a hip fracture. **Clinical Nutrition**, v. 26, n. 4, p. 460–465, 2007.

TIDERMAR, J.; PONZER, S.; CARLSSON, P. Effects of protein-rich supplementation and nandrolone in lean elderly women with femoral neck fractures. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 587-96, 2004.

TOMA, C.; PITTENGER, M. F.; CAHILL, K. S.; BYRNE, B. J.; KESSLER, P. D.

Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation**, v. 105, n. 1, p. 93-98, 2002.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, v. 38, n. 1, p.11–25, 2007.

TZAPHLIDOU, M. The role of collagen in bone structure: an image processing approach. **Micron**, v. 36, n.6-7, p. 593-601, 2005.

VANDERSCHUEREN, D.; VANDEROUT, L.; BOONEN, S.; LINDBERG, M. K.; BOULLON, R.; OHISSON, C. Androgens and bone. **Endocrine Reviews**, v. 25, n.3, p. 389-425, 2004.

VASSEUS, P. B. **Articulação do joelho**. In: SLATTER, D. (Ed.), Manual de cirurgia de pequenos animais. Manole, São Paulo, p. 2090-2116, 2007.

VELLOSO, G. R. Fraturas: origens e tratamentos. **Universidade Ciência e Saúde**, v. 3, p. 297-301, 2005.

XIA, H.; LIANG, C.; LUO, P.; HUANG, J.; HE, J.; WANG, Z.; CAO, X.; PENG, C.; WU, S. Pericellular collagen i coating for enhanced homing and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in direct intra-articular injection. **Stem Cell Research and Therapy**, v.9, n. 1, p. 174, 2018.

XU, G.; ZHANG, X. F.; SUN, L. CHEN, E. Current and future uses of skeletal stem cells for bone regeneration. **World Journal of Stem Cells**. V. 12, n. 5, p. 339-350, 2020.

ZAMARIAN, T. P. **Avaliação do processo de reparo em falhas ósseas induzidas em tibias de coelhos tratados com decanoato de nandrolona**. 2014, p. 61. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2014.

ZHANG, W.; WALBOOMERS, X. F.; SHI, S.; FAN, M.; JANSEN, J. A. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 10, p. 2813-2823, 2006;

WAGNER, W.; WEIN F.; SECKINGER, A.; FRANKHAUSER, M.; WIRKNER, U.; KRAUSE, U.; BLAKE, J.; SCHWAGER, C.; ECKSTEIN, V.; ANSORGE, W.; HO, A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 11, p. 1402-1416, 2005.

WEST, F.D.; HENDERSON, W.M.; YU P.; YANG, J.Y.; STICE, S.L.; SMITH, M.A. Metabolomic response of human embryonic stem cell-derived germ-like cells after exposure to steroid hormone. **Toxicological Sciences**, v. 129, n. 1, p. 9–20, 2012.

WHITEHAIR, J. G.; VASSEUR, P. B.; WILLITS, N. H. Epidemiology of cranial

cruciate ligament rupture in dogs. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 203, p. 1016-1019, 1993.

WOODS, E. J.; PERRY, B. C.; HOCKEMA, J. J.; LARSON, L.; ZHOU, D.; GOEBEL, W. S. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. **Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 150-157, 2009.

YAMADA, Y.; NAKAMURA-YAMADA, S.; KUSANO, K.; BABA, S. Clinical Potential and Current Progress of Dental Pulp Stem Cells for Various Systemic Diseases in Regenerative Medicine: A Concise Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1132, 2019.

YE, X.; ZHANG, P.; XUE, S.; XU, Y.; TAN, J.; LIU, G. Adipose-derived stem cells alleviate osteoporosis by enhancing osteogenesis and inhibiting adipogenesis in a rabbit model. **Cytotherapy**, v. 16, n. 12, p. 1643–55, 2014.

YEN, A. H. H.; SHARPE, P. T. Stem cells and tooth tissue engineering. **Cell Tissue Research**, v. 331, p. 359-372, 2008.

ANEXO A

Termo de consentimento livre e esclarecido entregue aos proprietários dos animais selecionados para o estudo

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO OU RESPONSÁVEL

NOME: _____ DOCUM
 ENTO DE IDENTIDADE N° : _____ SEXO : M F
 DATA NASCIMENTO: ____/____/_____.
 ENDEREÇO: _____ N°:
 _____ COMPLEMENTO: _____
 BAIRRO: _____ CIDADE: _____
 ESTADO: _____
 CEP: _____ TELEFONE: (____) _____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

NOME DO ANIMAL: _____
 ESPÉCIE: _____ RAÇA: _____
 PELAGEM: _____ N° DE IDENTIFICAÇÃO _____
 SEXO: _____ DATA DE NASCIMENTO: _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Interferência do decanoato de nandrolona associado com células tronco na consolidação óssea do defeito resultante da osteotomia para avanço da tuberosidade tibial em cães.

PESQUISADOR: Danilo Roberto Custódio Marques, Médico Veterinário , CRMV-PR 10.555,

Departamento: Departamento de Cirurgia, setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Selvagens

– FMVZ – USP

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR

DURAÇÃO DA PESQUISA: 30 meses.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

O presente estudo visa comparar o tempo de consolidação do defeito gerado pelo avanço da tuberosidade tibial com o uso de células tronco associado ou não com decanoato de nandrolona em cães com diagnóstico de ruptura do ligamento cruzado cranial. Objetiva-se avaliar se o uso de células tronco associado a células tronco interfere no tempo de consolidação óssea do defeito resultante da TTA.

Local da cirurgia: Hospital Veterinário da Faculdade Anclivepa (HV-Faculdade Anclivepa), localizado na Rua Platina, 560, município de São Paulo, São Paulo. Serão utilizados no mínimo 24 cães, 6 em cada grupo, submetidos à cirurgias de TTA. Aprovação da comissão de ética da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) pelo protocolo número 7250220817 da CEUA.

Os animais serão divididos aleatoriamente em quatro grupos: grupo C (controle) somente TTA; grupo CT (células tronco): TTA mais células tronco na falha óssea; grupo CTDN (células tronco associado com decanoato de nandrolona): TTA, células tronco e decanoato de nandrolona pela via intramuscular na dose de 2mg/kg no pós-operatório imediato e cada 21 dias de aplicação até a observação da consolidação óssea; grupo DN (decanoato de nandrolona): TTA e decanoato de nandrolona pela via intramuscular na dose de 2mg/kg no pós-operatório imediato e a cada 21 dias até a observação da consolidação óssea.

Exames: creatinina, úreia, urinálise, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, albumina e gamaglutamiltransferase. Esses mesmos exames serão repetidos após 7 dias de pós-operatório e depois a cada 21 dias e a utilização do decanoato de nandrolona será suspenso caso haja alterações séricas.

No pós-operatório todos os grupos receberam as seguintes medicações por via oral: cefalexina (25 mg/kg/cada 12 horas/7 dias); carprofeno (2.2mg/kg/cada 12 horas/7 dias) e cloridrato de tramadol (3mg/kg/cada 8 horas/5 dias) e dipirona (25mg/kg/cada 8 horas/7 dias). Além disso, uso de colar protetor até a retirada dos pontos e limpeza da ferida cirúrgica com solução salina 0.9% cada 12 horas, com auxílio de luvas, até retiradas dos pontos.

As radiografias serão realizadas individualmente no pré-operatório, pós-operatório imediato e a cada 21 dias em duas projeções: médio lateral (LL) e crânio caudal (VD) até a observação da consolidação óssea com uso do penetrometro para avaliação da densidade óssea.

Não haverá custo de nenhum dos procedimentos cirúrgico para o proprietário, ficando como responsabilidade do mesmo, somente o transporte do seu animal para a realização de todos os procedimentos, retorno nos dias propostos.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o médico veterinário Danilo Roberto Custódio Marques, que pode ser encontrado no endereço Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 Cid. Universitária, Universidade de São Paulo,

ANEXO B

Termo de parceria entre Hospital da Faculdade Anclivepa e Setor de Anatomia dos Animais Domésticos da Universidade de São Paulo

TERMO DE PARCERIA PARA EXECUÇÃO DE PROJETO DE DOUTORADO

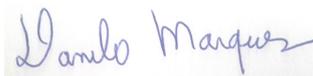
Termo de convênio de parceria que entre si celebram Hospital Veterinário Público da Anclivepa - com sede em rua Ulisses Cruz, 285, Belenzinho, São Paulo, São Paulo, 03308-010, CNPJ:45.877.305/0001-14, telefone 11-2291-5159, neste ato representada por seu representante legal infra-assinado, doravante denominada simplesmente – CONCEDENTE e, de outro lado, a **Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestre-**, Mantenedor da **Universidade de São Paulo – USP** -, CNPJ 63.025.530/0019-33, situada na Avenida Prof. Dr. Orlando Marques Paiva, 87, Prédio de Pós-graduação em Anatomia dos Animais domésticos e silvestres, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, São Paulo CEP 05.508-270, telefone 11- 3091-1431, neste ato representado pela Prof. Responsável pelo projeto e o aluno executante do projeto que abaixo assinam. Dispõe sobre a realização do projeto de doutorado do aluno Danilo Roberto Custodio Marques em parceria com Hospital Veterinário Público da Anclivepa-Tatuapé.

E por estarem assim de pleno acordo, assinam o presente instrumento em duas vias de igual forma e teor para os efeitos de direito em presença das testemunhas abaixo.

São Paulo, 23 de novembro de 2017.



Universidade de São Paulo – FMVZ-USP
Paula Fratini
Coordenadora Responsável pelo projeto
CPF: 294730788-70



Danilo R. C Marques – Doutorando Executante do Projeto
CPF: 229-721-318-27



Hospital Veterinário Público de São Paulo
Representante Legal José Fernando Ibañez

CPF 14787721828