

ALEXANDRE VASCONCELOS DE MEIRELLES

Estudo randomizado comparativo da enxertia
autóloga de células da medula óssea para
consolidação da pseudoartrose da tíbia em relação
aos tratamentos convencionais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade
Estadual Paulista, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto
Co-Orientador: Prof. Dr. Gildásio Daltro

Araraquara
2019

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS ARARAQUARA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Estudo randomizado comparativo da enxertia autóloga de células da medula óssea para consolidação da pseudoartrose da tíbia em relação aos tratamentos convencionais

ALEXANDRE VASCONCELOS DE MEIRELLES

Dissertação de Mestrado
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

M499e Meirelles, Alexandre Vasconcelos de
Estudo randomizado comparativo da enxertia autóloga de células da medula óssea para consolidação da pseudoartrose da tíbia em relação aos tratamentos convencionais / Alexandre Vasconcelos de Meirelles. – Araraquara : [s.n.], 2019
61 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Reinaldo Marchetto

Coorientador: Gildásio de Cerqueira Daltro

1. Pseudoartrose. 2. Células tronco. 3. Tíbia. 4. Consolidação da fratura. 5. Transplante autólogo. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

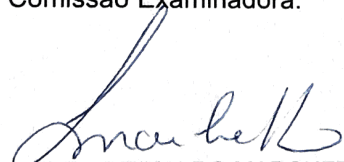
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estudo randomizado comparativo da enxertia autóloga de células da medula óssea para consolidação da pseudoartrose da tíbia em relação aos tratamentos convencionais"

AUTOR: ALEXANDRE VASCONCELOS DE MEIRELLES

ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO

COORIENTADOR: GILDÁSIO DE CERQUEIRA DALTRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ADEMÁRIO GALVÃO SPINOLA

Instituto de Saúde Coletiva / Faculdade de Medicina - UFBA - Salvador



Prof. Dr. LUIS SCHIPER

Departamento de Cirurgia Experimental e Especialidades Cirúrgicas / Faculdade de Medicina - UFBA - Salvador

Araraquara, 25 de abril de 2019

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Alexandre Vasconcelos de Meirelles

Nome em citações bibliográficas: MEIRELLES, A. V.; Meirelles, AV

Endereço profissional: Universidade Federal da Bahia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Ortopedia e Traumatologia. Rua Augusto Viana, s/n° Canela. 40110060 - Salvador, BA - Brasil.

Telefone: (71) 32838136

Endereço eletrônico: alv.0326@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2017 – 2019 Mestrado em Biotecnologia
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP,
Instituto de Química – Araraquara-SP.
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto
Co-Orientador: Prof. Dr. Gildásio de Cerqueira Daltro.
Palavras chave: ortopedia, pseudoartrose, tibia, transplante
autólogo de células tronco mesenquimais.
Grande área: Ciências da Saúde
- 2007 – 2009 Curso de Pós-Graduação em Perícia Médica – Fundação Unimed
Título: Hierarquia dos fatores relacionados com distúrbios
osteomusculares nos ombros e pescoço: uma revisão sistemática
- 2006 – 2007 Fellow em Cirurgia de Quadril e Pelve no Instituto de Ortopedia e
Traumatologia de Passo Fundo / RS
- 2002 – 2005 Especialização - Residência Médica.
Residência Médica em Ortopedia e Traumatologia Serviço
COT/Martagão Gesteira
- 2001 - Graduação em Medicina pela Escola Baiana de Medicina e Saúde
Pública

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- 2015 – 2019 Obras Sociais Irmã Dulce
Vínculo: Médico Ortopedista, Carga horária: 12h
- 2018 – 2019 Hospital Universitário Professor Edgard Santos, HUPES, Brasil.
Vínculo: Médico Ortopedista, Carga horária: 24
- 2004 – 2019 Hospital Manoel Victorino, Salvador-BA, Brasil
Vínculo: SERVIDOR PÚBLICO, Enquadramento Funcional:
Médico Ortopedista, Carga Horária: 12

2012 – 2019

Hospital Português, Salvador-BA, Brasil

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Médico
Ortopedista, Carga Horária: 36

ÁREAS DE ATUAÇÃO

*Grande Área: Ciências Biológicas/Área: Medicina/Subárea: Ortopedia

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

RIBEIRO, V. M. B.; FALEIRO, T. B.; Wellington La Picirelli de Souza; Eugenio Carlos da Rocha. Inovações na formação médica: com a palavra os Conselheiros Municipais de Saúde. In: XLIII Congresso Brasileiro de Educação Médica, 2005, Natal. Revista Brasileira de Educação Médica - XLIII Congresso Brasileiro de Educação Médica, 2005. v. 29. p. 282-282.

Neto, AVM; Paiva, RB; Parreiras, MS; Meirelles, AV; “Experiência em Colectomia Videolaparoscópica em 2 Hospitais Privados – Análise de Casuística.” V Congresso Brasileiro de Vídeo Cirurgia da SOBRASIL – maio/2001.

Agareno, S; Magalhães, AS; Parreiras MS; Meirelles, AV; Peixoto M; “Experiência em Colectomia videolaparoscópica em um Hospital Privado de Salvador – Análise de Casuística.” V Congresso Brasileiro de Vídeo Cirurgia da SOBRASIL – maio/2001.

Meirelles, AV; Cortizo, MBM; Rivision, M; Cunha, TC; Tavares, WIS; “Infecção de Sítio Operatório Superficial em Cirurgia Videolaparoscópica em dois Hospitais Privados – Análise de Casuística.” XXIV Congresso Brasileiro de Cirurgia – junho/2001.

Meirelles, AV; Cortizo, MBM; Santos, MCN; Neto, AVM; França G; “Infecção de Sítio Operatório Superficial em Pacientes Operados em Único Hospital Privado da Cidade de Salvador - BA – Análise de Casuística.” XXIV Congresso Brasileiro de Cirurgia – junho/2001.

Viveiros AM; Meirelles, AV; Júnior HLC; Gomes SBS; Santos, RN “O acesso de Ganz com luxação controlada da cabeça femoral em lesões traumáticas do quadril” XVII Congresso Brasileiro de Trauma Ortopédico – maio/2011.

Viveiros AM; Meirelles, AV; Júnior HLC; Gomes SBS; “O acesso de Ganz com luxação controlada da cabeça femoral em lesões traumáticas do quadril “XIV Congresso Brasileiro de Quadril – setembro/2011

Meirelles, AV; Santos, RN, Silva, AC; Viveiros AM “Tratamento de Luxação Inveterada do Quadril pela Técnica de Ganz” XIV Congresso Brasileiro de Quadril – setembro/2011.

AGRADECIMENTOS

Fazer o curso de Mestrado foi um grande desafio, uma longa, difícil e recompensadora jornada na qual precisei da ajuda de pessoas fundamentais para que esta trajetória tivesse êxito. Agradeço a todas elas, principalmente:

À minha família que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, auxiliando e incentivando-me em mais esta conquista;

Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto pela orientação, confiança e ensinamentos inestimáveis;

Ao Professor Dr. Saulo Santesso pela cooperação e disponibilidade;

Ao Professor Gildásio Daltro pelas oportunidades de aprendizado e pelas inestimáveis colaborações na realização desse projeto;

Ao Serviço de Ortopedia e traumatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) pela parceria e auxílio prestado;

Ao Dr. Roberto Meyer pela colaboração técnico-científica que tornou o projeto factível;

Ao Dr. Victor Fortuna pelo empenho, ensinamento e dedicação à pesquisa e em especial a esse projeto;

Ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade federal da Bahia pelo apoio técnico e disponibilidade de infraestrutura para viabilidade da pesquisa;

Aos voluntários que tão generosamente participaram deste estudo, possibilitando e contribuindo para a realização deste trabalho;

RESUMO

Pseudoartrose é definida como a ausência de evidências radiográficas do processo de consolidação de uma fratura. Células-tronco, são células com capacidade de proliferar e originar células de qualquer linhagem, formando qualquer tecido do organismo. Estudos com animais demonstraram que o uso de medula óssea contendo células do estroma melhoram os resultados do tratamento das pseudoartroses, mas os dados ainda são experimentais e necessitam de mais testes, com número relevante de pacientes, para demonstrar sua segurança e eficácia. Desta forma, este trabalho objetiva a comparação do método tradicional de tratamento da pseudoartrose da tíbia, realizado com o uso de fixador externo, haste ou placa e parafuso com o tratamento combinado do uso das técnicas convencionais e infiltração de células-tronco mesenquimais autólogas. Para isso, foram feitos ensaios clínicos randomizados, aberto, com cegamento dos grupos experimentais, com 18 pacientes diagnosticados com pseudoartrose divididos em dois grupos: grupo controle, formado por 9 pacientes e grupo experimental, também com 9 pacientes. A idade média do grupo foi de 38,3 anos e a maioria se autodeclarou pardo ou negro. O nível de escolaridade mostrou-se baixo, com 72 % dos participantes não tendo concluído o Ensino Médio. Cinco pacientes foram tratados com uso de haste metálica e apenas três tiveram a colocação de fixador externo. O tempo de doença (pseudoartrose) e o tempo cirúrgico não mostraram influenciar no desfecho. Em relação ao desfecho clínico, pacientes tratados com a combinação de técnicas convencionais associadas à enxertia autóloga de células tronco mesenquimais foram mais favoráveis e, quando comparados com o grupo controle, mostrou-se estatisticamente significativa. Os estudos mostraram que o uso de células tronco mesenquimais associado a técnicas cirúrgicas clássicas para consolidação de pseudoartrose de tíbia mostrou-se capaz de interferir no desfecho clínico e melhorar as condições dos pacientes submetidos a essa nova abordagem terapêutica

.

Palavras Chaves: Pseudoartrose, Células Tronco, Fratura de tíbia

ABSTRACT

Pseudoarthrosis is defined such as no radiographic evidence during consolidation fracture process. Stem cells are undifferentiated cells, multipotent, capable of proliferating and originating cells of any lineage, forming any tissue of the body. Animal studies have shown that using bone marrow containing stromal cells improves the results of pseudoarthrosis treatment, but the results are still experimental and require further testing with a significant number of patients to demonstrate their safety and efficacy. Thus, this study aims to compare the traditional method of treatment of tibial pseudoarthrosis, performed with the use of external fixator, rod or plate and screw with the combined treatment of the use of conventional techniques and infiltration of autologous mesenchymal stem cells. For this, randomized, open-label clinical trials with blinded experimental groups were performed with 18 patients diagnosed with pseudoarthrosis divided into two groups: a control group consisting of 9 patients and an experimental group, also with 9 patients. The mean age of the group was 38.3 years old and the majority self-declared brown or black. The level of schooling was low, with 72% of the participants not having finished high school. Five patients were treated with metal rod and only three had external fixator placement. Disease duration (pseudoarthrosis) and surgical time did not influence the outcome. Regarding the clinical outcome, patients treated with the combination of conventional techniques associated with autologous mesenchymal stem cell grafting were more favorable and, when compared with the control group, were statistically significant. The studies showed that the use of mesenchymal stem cells associated with classical surgical techniques for the consolidation of tibial pseudoarthrosis was able to interfere in the clinical outcome and to improve the conditions of the patients submitted to this new therapeutic approach.

Key Words: Pseudoarthrosis, Stem Cells, Fracture of Tibia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura macroscópica e microscópica do tecido ósseo humano	16
Figura 2	Síntese proteica óssea	19
Figura 3	Estruturas da tíbia	21
Figura 4	Modelo esquemático de suprimento sanguíneo em tíbia	22
Figura 5	Alguns tipos de pseudoartrose	27
Figura 6	Tratamento operatório com fixador externo circular	29
Figura 7	Técnica de Masquelet	30
Figura 8	Modelo esquemático de diferenciação de células tronco mesenquimais	32
Figura 9	Punção de aspiração de medula	38
Figura 10	Imagens do material coletado	39
Figura 11	Imagem da SEPAX e das substâncias químicas utilizadas na separação de CTM	40
Figura 12	Imagem da infusão de células tronco em tíbia	40
Figura 13	Comparação de percentagens de fratura de tíbia esquerda e direita	43
Figura 14	Comparação de causas de fratura em tíbia – grupos teste e controle	44
Figura 15	Gráfico comparativo da percepção de dor entre os pacientes	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil epidemiológico dos grupos teste e controle	42
Tabela 2	Relação dos parâmetros cirúrgicos entre os grupos	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Dados do procedimento cirúrgico por paciente participante da pesquisa	45
----------	---	----

ABREVIATURAS

- 1 CTM – CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
- 2 CD – PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE CELULAR
- 3 G-CSF – FATOR ESTIMULADOR DE CRESCIMENTO DE COLÔNIA
- 4 CBFA1 – GENE DE INDUÇÃO DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ÓSSEAS
- 5 IGF – FATOR SEMELHANTE A INSULINA
- 6 TGF-B – FATOR DE TRANSFORMAÇÃO BETA
- 7 PDGF – FATOR DERIVADO DE PLAQUETA
- 8 BMP - PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS OSTEOINDUTORAS
- 9 MHC – COMPLEXO MAIOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE
- 10 PAF – PERFURAÇÃO POR ARMA DE FOGO
- 11 PEMF – CAMPO DE PULSAÇÃO LETROMAGNÉTICA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	FORMAÇÃO E ESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO	15
2.2	A ESTRUTURA ÓSSEA DA PERNA	20
2.3	ANATOMIA DO SEGMENTO TIBIAL	20
2.4	FRATURA DE TÍBIA	23
2.5	FISIOPATOLOGIA DAS PSEUDOTROSES	23
2.6	CLASSIFICAÇÃO DA PSEUDOARTROSE	26
2.7	TRATAMENTO DAS PSEUDOARTROSES	28
2.8	TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO	31
3	OBJETIVO GERAL	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	36
4.2	ASPECTOS ÉTICOS	36
4.3	POPULAÇÃO DE ESTUDO E COLETA DE DADOS	37
4.4	OBTENÇÃO DA AMOSTRA BIOLÓGICA	38
4.5	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DAS TÉCNICAS	41
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
7	REFERÊNCIAS	50
8	ANEXOS	55

1. INTRODUÇÃO

A pseudoartrose é entendida como a situação em que a fratura de um osso não mostra evidências radiográficas de progressão do processo de consolidação. Ainda do ponto de vista radiológico, esse fenômeno é identificado pela presença de esclerose nas extremidades da fratura, hiato ósseo, calo ausente ou hipertrófico e persistência ou alargamento do traço de fratura. Portanto, não há união dos fragmentos da fratura, levando à formação de uma pseudocápsula com sinóvia e líquido sinovial (MAHENDRA; MACLEAN, 2007; WECHMANN *et al.*, 2018). Alguns autores acrescentam a esse quadro radiográfico, a necessidade de constatação de que a fratura não apresenta consolidação e não há evidência de que possa ocorrer sem melhora das condições mecânicas e/ou biológicas (GRANDI; ELIAS; SKAF, 2007).

O tratamento de defeitos ósseos extensos, provocados por traumas ou patologias, constitui um desafio da área médica, em especial para cirurgia ortopédica que, invariavelmente, depende do processo de regeneração tecidual para obtenção de desfechos favoráveis ao paciente. Objetivando superar a morbidade de enxertos autógenos e as limitações de enxertos alógenos, xenógenos e aloplásticos, têm se desenvolvido muitos estudos relacionados à terapêutica com base nos fundamentos da Bioengenharia, utilizando células-tronco mesenquimais (CTM) e dispositivos implantáveis para favorecer o processo regenerativo (MENEZES *et al.*, 2016).

Células-tronco são células indiferenciadas, multipotentes, com capacidade de proliferar e originar células de qualquer linhagem, formando qualquer tecido do organismo (CAPLAN, 1991). As células-tronco são classificadas como células-tronco embrionárias, que são achadas na massa celular interna do blastocisto (embrião), ou em células-tronco somáticas ou adultas, que são achadas em tecidos desenvolvidos do feto, recém-nascido ou no adulto. Estas podem ser obtidas através de sangue periférico, cordão umbilical, fígado fetal, tecido neural, medula óssea ou outros diversos tecidos mesenquimais do adulto, tais como sinóvia, periósteo, tecido muscular ou tecido adiposo (MAITRA *et al.*, 2004).

Na medula óssea existem pelo menos duas populações de células-tronco progenitoras: as células progenitoras hematopoéticas e as células progenitoras mesenquimais. As células progenitoras hematopoéticas expressam o antígeno de superfície CD34, uma glicoproteína de membrana que permite sua identificação e quantificação. Outras células também expressam a mesma proteína de membrana, a saber: célula endotelial, fibroblasto embrionário e algumas células do tecido nervoso fetal e adultos (LE BLANC *et al.*, 2003). Já as células progenitoras mesenquimais não apresentam nenhum marcador de superfície celular conhecido, podendo ser encontradas também em diversos órgãos sólidos e sendo identificadas somente pela cultura celular. Essas duas populações de células estão presentes na medula óssea e em condições normais; apenas 0,1% de células circulam no sangue periférico. Este número pode ser aumentado em aproximadamente 30-50 vezes após a administração de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas, especialmente o G-CSF (Fator Estimulador de Crescimento de Colônias) (TSE *et al.*, 2003).

As células mesenquimais possuem capacidade de autorenovação e diferenciação múltipla, sendo vistas como reservatórios presentes no corpo humano até que, sob estímulos locais, haja mobilização e direcionamento para um fenótipo celular específico, a exemplo: uma célula constituinte do osso (BIANCO *et al.*, 2008). No campo da Cirurgia ortopédica, a técnica de enxertia de células tronco do tipo mesenquimais vem se mostrando promissora no tratamento das pseudoartroses, mas os estudos ainda são incipientes (GIGLIO *et al.*, 2015).

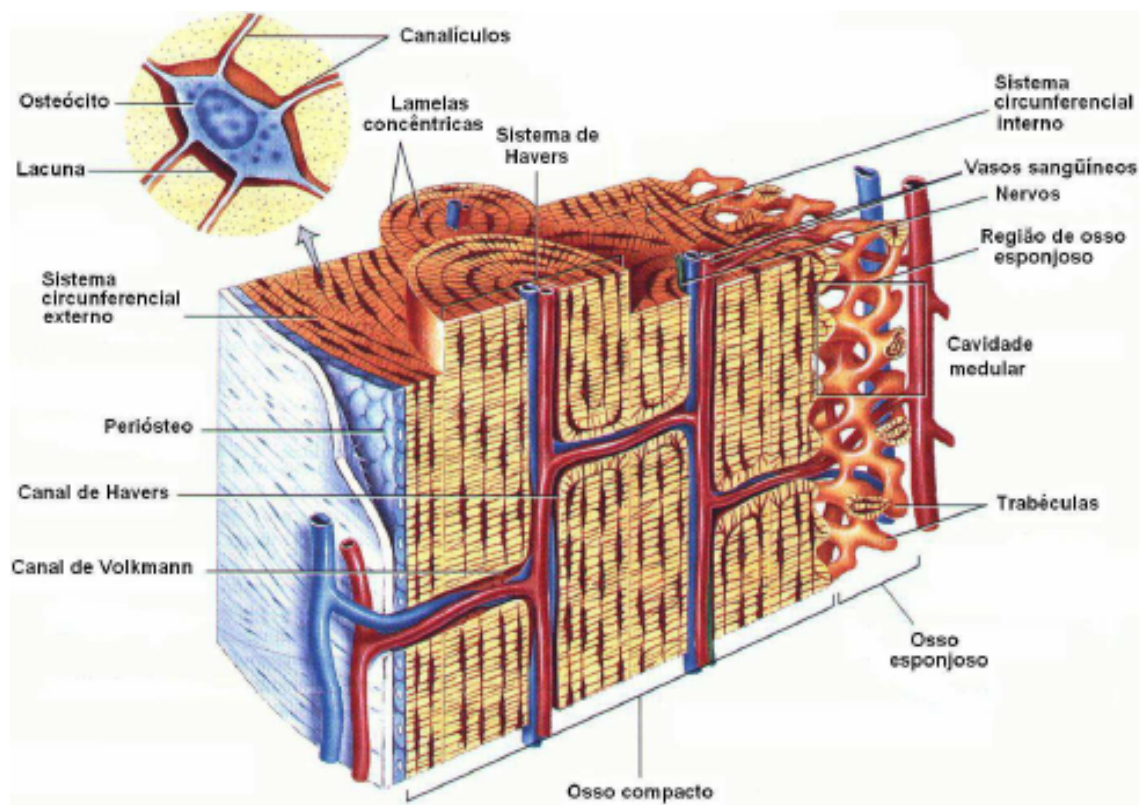
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Formação e estrutura do tecido ósseo

O osso compreende um tipo de tecido conjuntivo com matriz extracelular formada a partir da incorporação de componentes químicos, principalmente cristais de hidroxapatita, depositados no interior de células especializadas durante o processo de mineralização (HEBERT *et al.*, 2017). A presença de

cristais de hidroxiapatita é responsável pela dureza e flexibilidade limitada do tecido ósseo fazendo com que o mesmo realize suas funções de manutenção e proteção de órgãos e tecidos. Bioquimicamente, o tecido ósseo desempenha um papel importante no metabolismo do cálcio e fósforo, servindo como um grande reservatório para ambos os minerais. Do ponto de vista macroscópico, é possível identificar dois tipos de tecidos ósseos: o cortical e o esponjoso, também denominado trabecular. O primeiro é mais denso e está localizado na parte externa do osso. Desempenha um papel importante na capacidade de suporte mecânico do tecido. O trabecular, por sua vez, é formado por uma rede de trabéculas ósseas ou espículas, que define e sustenta a medula óssea. Embora sejam anatomicamente distintos e localizem-se em diferentes regiões dos ossos, os tecidos ósseos trabecular e compacto têm o mesmo componentes da matriz extracelular, como pode ser observado na Figura 1 (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Figura 1. Estrutura macroscópica e microscópica do tecido ósseo humano.



Fonte: Atlas de Anatomopatologia da UNICAMP, 2002

Do ponto de vista embriogênico, as células do tecido ósseo originam-se da célula indiferenciada (célula tronco) do mesênquima embrionário. Essa é capaz de originar também os demais tecidos mesenquimais – conjuntivo propriamente dito, cartilaginoso, adiposo, muscular, mucoso e hematopoiético. As células de origem mesenquimal, já comprometidas geneticamente com suas linhagens, são chamadas de células-fonte ou auto-regenerativas e permanecem no organismo após o nascimento como “nichos celulares” (ZUC *et al.*, 2001). No tecido ósseo, estas células são denominadas células osteoprogenitoras e são estimuladas à proliferação e à diferenciação quando as células maduras chegam ao término de sua vida-útil ou quando estimuladas bioquimicamente na consolidação de fraturas ou em condições patológicas como neoplasias ou hiperplasias ósseas reacionais (HERNANDEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2013).

Os componentes das células ósseas provêm de duas linhagens distintas, ambas mesenquimais. A célula osteoprogenitora surge diretamente a partir das células mesenquimais indiferenciadas, chamadas células tronco do adulto ou “células-fonte”, e persistem como células ósseas de revestimento no perióstio e, segundo alguns autores, no endóstio (KUZNETSOV *et al.* 2001). Essas células surgem, morfologicamente, a partir da contração dos prolongamentos citoplasmáticos da célula mesenquimal e diminuição de volume total celular. Geneticamente, nesta fase, ocorre a transcrição de genes específicos, como o CBFA1 (expressão induzida fisiologicamente e sinteticamente pela proteína morfogenética osteoindutora-7) e RUNX-2, sendo este o primeiro passo para que a célula mesenquimal indiferenciada seja, futuramente, uma célula osteoprogenitora que originará os osteoblastos e osteoclastos. Durante esse processo, fatores de crescimento como a leptina, o IGF (Fator Semelhante a Insulina), o TGF- β (Fator de Transformação - β) e o PDGF (Fator Derivado de Plaquetas) participam, isolados ou combinados, do estímulo para diferenciação das células mesenquimais em células osteoprogenitoras e destas para osteoblastos ativos ou em repouso (células ósseas de revestimento) (KERN *et al.*, 2006).

Também a partir das células indiferenciadas do mesênquima, surgem os hemocitoblastos. Estas células se originam a partir da formação de aglomerados celulares no saco vitelino, chamados Ilhotas de Wolf, onde as células situadas

na porção mais externa dão origem às células epiteliais de revestimento pavimentosas simples formadoras do endotélio vascular, enquanto que aquelas situadas na área central dão origem aos hemocitoblastos, formadores de todos os elementos celulares do sangue (KARP *et al.*, 2009).

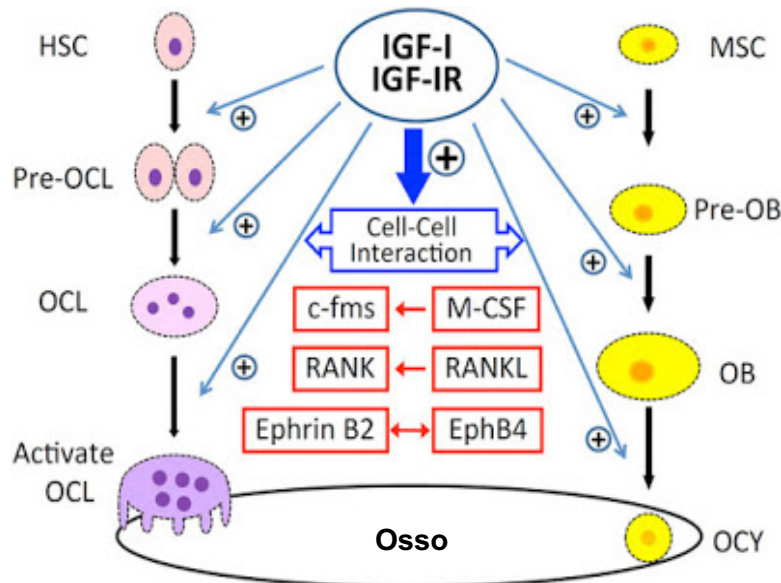
A partir do surgimento dos primeiros osteoblastos, inicia-se a atividade de síntese proteica, a saber: osteóide – composto principalmente por feixes de colágeno Tipo I (formando a base estrutural do tecido), e um conjunto de proteínas “não-colagenosas” – osteonectina, que possibilita a junção dos osteoblastos à interface óssea, osteocalcina, com função quimiotática para íons cálcio e fósforo séricos e expressão controlada pela forma ativa da vitamina D, sialoproteína e osteopontina, que ativam conjuntamente a mineralização e inibem o metabolismo proteico, GM-CSF, fator de crescimento que induz a diferenciação das células indiferenciadas na medula óssea em células comprometidas geneticamente com a linhagem granulocítica ou mielocítica, originando o SFM, RANK e RANKr, que possibilitam a ativação da osteoclastogênese a partir das células monocíticas e estimulam o amadurecimento osteoclástico, bem como inibem a apoptose deste tipo celular, osteoprotegerina, com função antagônica a RANK, além das proteínas morfogenéticas osteoindutoras (BMP's) (KITAORI *et al.*, 2009). A síntese protéica óssea pode ser observada no esquema representado na Figura 2.

É possível observar que os osteoblastos exercem controle metabólico no tecido como um todo, controlando a mineralização da matriz, assim como a diferenciação, amadurecimento e atividade osteoclástica – o que é extremamente importante na renovação tecidual – o que é e na osteogênese embrionária ou associada à consolidação de fraturas. A interação destas duas células parenquimatosas – osteoblastos e osteoclastos, depende também dos osteócitos – osteoblastos em estágio final de amadurecimento, sem atividade sintética, mas fundamental para a captação iônica sérica e remoção de catabólitos teciduais (HUNG *et al.*, 2011).

O osso tem em sua composição uma matriz de sais inorgânicos e colágeno, que é encontrado em todo o tecido conjuntivo. Os minerais cálcio e fosfato, aliados ao colágeno, constituem cerca de 60 a 70% do tecido ósseo e a água constitui aproximadamente 25 a 30% do peso ósseo (NORDIN *et al.*, 2003).

Os osteoblastos são envolvidos pela substância fundamental secretada, eles ficam confinados em espaços estreitos posicionados entre as lamelas do ósteon.

Figura 2. O IGF-1 induz à síntese de RANK-L e, conseqüentemente, a osteoclastogênese e melhora a função dos osteoclastos (MOCHIZUKI *et al.*, 1992). O IGF-1 induz à expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células ósseas, e VEGF pode servir para acoplar a angiogênese na formação óssea endocondral e com a diferenciação dos osteoblastos e função (AKENO *et al.*, 2002).



Esses osteoblastos em confinamento, tecnicamente, passam a se chamar osteócitos. Os ossos são atravessados pelos vasos sanguíneos, onde partem do periósteo externo e das superfícies endósteas internas (SIZÍNIO *et al.*, 2013). O estresse causa uma deformação (mudança de direção) que acontece dentro da estrutura óssea, em resposta às cargas aplicadas no sentido de fora para dentro do osso. Basicamente a deformação pode ser linear, causando mudança no comprimento da espécie, e a deformação tangencial, que leva a mudanças nas relações angulares dentro da estrutura óssea (HOPPENFELD *et al.*, 2011). Estresse é uma carga ou força por unidade de área que se desenvolve em uma superfície plana dentro de uma estrutura em resposta às cargas aplicadas externamente. As três formas de medir o estresse no osso são as unidades padronizadas, como o Newton por centímetro quadrado (N/cm²); Newton por metro quadrado ou pascal (N/m², pa); e o meganewton por metro quadrado ou megapascal (MN/m², MPa) (SIZÍNIO *et al.*, 2013).

2.2. A estrutura óssea da perna

A perna é constituída por dois ossos verticais, a tibia e a fíbula, que se estendem do joelho ao tornozelo e participam na estrutura e função destas importantes articulações. Ela serve como suporte para sustentação do corpo, apresenta-se como um conduto para o suprimento neurovascular do pé e com os seus tecidos moles circundantes assimétricos determina a forma da perna. Sua secção transversa externa aproximadamente triangular tem um ápice dirigido anteriormente (CHAMLIAN, 2014).

A tibia possui duas epífises ampliadas cujo papel é aumentar as superfícies de contato da articulação para reduzir as pressões em seu nível. A epífise proximal geralmente é oval com o seu eixo maior transversal e ligeiramente deslocada para trás, transporta as duas superfícies superiores articulares (côndilos, glenoide, platôs), uma lateral e uma medial que toma uma forma quadrangular. Entre as suas duas epífises, a tibia tem um segmento diafisário ou corpo com três lados, um posterior, um ântero-medial e um ântero-lateral. A fíbula tem um aspecto muito menor, com comprimento próximo ao da tibia, mas menor do que o corpo das duas extremidades. A epífise proximal ou cabeça se articula com a tibia para formar a articulação tibiofibular proximal, uma articulação do tipo sinovial. Funcionalmente mais importante, a epífise distal ou maléolo lateral desce mais baixo do que a sua contraparte medial na tibia e aparece coberto com cartilagem na face medial para articular com a face lateral (HERBERT, 2017).

2.3. Anatomia do segmento tibial

Na anatomia humana, a tibia é o segundo maior osso, fortemente vinculado à fíbula, possui uma forma triangular apresentando três bordas: anterior, medial e lateral (Figura 3), podendo ser palpada na borda anterior e face medial, nela encontram-se inserido os músculos tibiais anteriores e posteriores que juntos realizam a dorsiflexão, flexão plantar, inversão e eversão do tornozelo (NEUMANN, 2011). A tibia é medial e mais resistente em relação à fíbula articulando-se com o fêmur pela sua extremidade proximal. Estes ossos articulam-se distalmente com o tálus, sendo que a tibia é responsável pela

transmissão do peso (HAMILL *et al.*, 2012). A situação superficial do segmento tibial explica a frequência do trauma nesse nível e a vulnerabilidade das estruturas anatômicas danificadas.

Figura 3. Estruturas da tíbia



Fonte: NETTER, 2015, adaptado

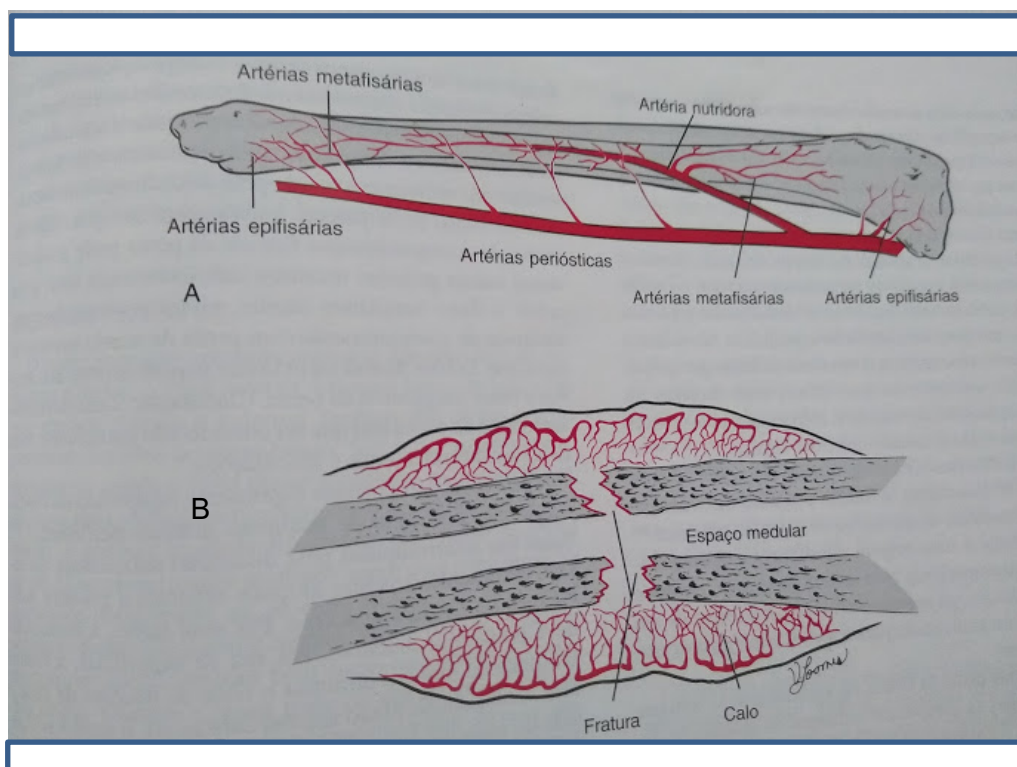
A fáscia separa a perna em quatro compartimentos contendo músculos, vasos e nervos. Os compartimentos anterior, posterior e profundo fazem fronteira com a tíbia e estão em risco de síndrome compartimental nas fraturas da tíbia. Os ligamentos e meniscos da articulação do joelho também estão em contato com a tíbia proximal e correm risco de lesão associada a fraturas da tíbia (NETTER, 2015).

A artéria tibial posterior emite um ramo proximal que é responsável por todo suprimento sanguíneo diafisário da tíbia. Anatomicamente, esse ramo arterial entra obliquamente na diáfise tibial pela superfície posterior, na porção proximal do terço médio do osso. Essa localização é responsável, em parte, pela lesão provocada pelo desvio de uma fratura através do longo forame cortical. Dessa forma, uma fratura desviada de diáfise tibial quase sempre desvasculariza a diáfise a jusante da artéria nutridora. Uma vez ocorrendo significativo desnudamento dos tecidos moles periféricos, todo o suprimento vascular pode ser perdido, comprometendo vários centímetros para além da área lesionada. Perda combinada de suprimento sanguíneo medular e perióstico interfere na

consolidação da fratura, aumentando o risco de desenvolvimento de pseudoartrose (RHINELANDER, 1974).

Após uma fratura diafisária de tíbia, o padrão de suprimento sanguíneo muda dramaticamente em comparação ao que é visto na tíbia intacta. Nessa situação, o suprimento da cortical passa a ser feito pelo recrutamento de vasos arteriais periféricos. Esse remodelamento visa revascularizar áreas necróticas e fornecer nutrição para o calo periférico. Este processo prescinde de tecidos adjacentes saudáveis e é mais eficaz nas áreas com músculos estreitamente aplicados a tíbia. As superfícies cobertas apenas por periósteo, tecido subcutâneo e pele tem menor probabilidade de beneficiar-se com esse suprimento sanguíneo extra ósseo temporário (Figura 4) (RHINELANDER, 1987).

Figura 4. Modelo esquemático de suprimento sanguíneo em tíbia intacta (A) e tíbia fraturada (B)



2.4. Fratura de tíbia

As fraturas da diáfise da tíbia são as mais comuns de ossos longos e acomete principalmente adultos jovens do sexo masculino, indivíduos em plena capacidade física e laborativa. Entre as causas mais frequentes estão os traumas de alta-energia como os acidentes automobilísticos, motociclísticos e atropelamentos, além das fraturas em consequência de ferimento por projétil de arma de fogo. Por causa da energia causadora das fraturas da tíbia e da sua escassa cobertura cutânea ânteromedial, a tíbia, também é o osso longo que mais frequentemente sofre fratura exposta. Nesses traumas de alta energia é essencial identificar a classificação das fraturas diafisárias das tíbias para um tratamento eficaz ao paciente (ARRUDA., 2009).

Estas fraturas são classificadas em expostas, fechadas, estáveis e instáveis. As expostas ocorrem quando há uma comunicação da fratura com o meio exterior e as fechadas não existem essa relação. As fraturas denominadas estáveis ocorrem quando os fragmentos estão de acordo com o posicionamento anatômico da estrutura afetada e instável quando os fragmentos ósseos estão desviados da posição anatômica (STANDRING, 2016).

2.5. Fisiopatologia das Pseudoartroses

Não há consenso entre os autores quanto à relação temporal estabelecida para o diagnóstico da pseudoartrose. Por essa razão, foi criado o termo “retardo de consolidação”- diagnóstico intermediário que designava o hiato entre o tempo normal de consolidação da fratura (que depende de inúmeras variáveis – energia envolvida, lesão de partes moles, forma de tratamento, infecção, etc.) e a pseudoartrose (que também não tem tempo definido para ser diagnosticada). Nos dias atuais, a maioria dos autores refere aguardar entre seis a oito meses para se estabelecer o diagnóstico. Assim, considere-se pseudoartrose, a situação clínica e radiográfica de possibilidade mínima (ou mesmo impossibilidade) de consolidação de uma fratura ou osteotomia, independentemente do tempo de evolução. A pseudoartrose é, geralmente, de natureza multifocal e pode determinar um impacto negativo na qualidade de vida do paciente na mesma proporção das doenças sistêmicas crônicas (WAJDI *et al.*, 2018).

Os principais fatores que conduzem a pseudoartrose são a instabilidade e a falta de vascularização adequada no local da lesão. Outros fatores são: infecções, falta de cooperação do paciente e neuropatias. Fatores gerais, tais como desnutrição, uso de anticoagulantes e/ou anti-inflamatórios, irradiação e queimaduras podem contribuir, mas não constituem causas primárias da falta de união (WAJNSZTEJN *et al.*, 2001)

A estabilização inadequada de uma fratura com osteossíntese pode permitir movimentação excessiva no foco da fratura, dificultando ou impedindo a consolidação. A presença de espaço entre as extremidades da fratura pode ocorrer devido à distração, interposição de tecidos moles, perda óssea ou má posição, que é causada pelo desvio ou cavalgamento dos fragmentos da fratura (GIGLIO *et al.*, 2015).

Segundo a teoria de Perren e Cordey, a atuação dos osteoblastos depende necessariamente de estabilidade. Espaços interfragmentários significativos não podem ser preenchidos por tecido ósseo neoformado. Se uma placa com parafusos mantém um espaço de aproximadamente 3 a 4 milímetros entre os fragmentos ósseos, o osteoblasto é incapaz de se desenvolver, cedendo lugar a condroblastos e fibroblastos, os quais são capazes de tolerar melhor o alto esforço e produzir tecido fibrocartilaginoso que, preenchendo o espaço, melhora a condição de estabilidade (KATO, 2009).

Em contraposição, em um grande intervalo causado, por exemplo, pela perda de osso diafisário, o esforço é demasiadamente baixo para estimular os osteoblastos. Dessa forma, os fibroblastos preencherão o espaço quando as células mais especializadas não puderem se multiplicar (KATO, 2009).

Os osteoblastos exigem estabilidade perfeita para que os capilares de revascularização possam cruzar as linhas de fratura e facilitar a transformação fenotípica de células pluripotentes em osteoblastos. Isso possibilita que a remodelação haversiana primária sem calo periosteal ocorra. A fixação com compressão interfragmentária elimina espaços macroscópicos pela redução anatômica e compressão dos fragmentos da fratura; ela também elimina o movimento, permitindo a proliferação osteoblástica e a consolidação (LABRONICI *et al.*, 2011).

Quando há movimento no foco da fratura, mas com bom suprimento sanguíneo, será formado tecido cartilaginoso que persistirá enquanto houver

movimento. Se a estabilidade for alcançada naturalmente ou for produzida por fixação externa ou interna apropriada, a calcificação da cartilagem será iniciada, o que, subsequentemente, possibilitará a substituição da cartilagem por osso, como no processo de ossificação endocondral. Se o movimento persistir com uma amplitude na qual a calcificação não possa ocorrer, então o espaço fibrocartilaginoso persistirá e uma pseudoartrose hipertrófica se estabelece (MA *et al.*, 2014).

Outra teoria bastante difundida é a de *strain* de Perren, que determina que a deformação relativa no foco de fratura estabilizado depende do tamanho da lacuna de fratura original. Fraturas redutíveis (sem cominuição) são consideradas de alto *strain*, pois uma pequena força aplicada à linha de fratura resulta em grande movimentação com efeito deletério ao processo de consolidação. O presente trabalho revisa a literatura disponível a respeito de fatores que influenciam a mecânica de fraturas de alto *strain* em medicina veterinária, seus métodos de tratamento e a física por trás dos implantes disponíveis. Cada configuração de fratura requer atenção especial e cuidado crítico na escolha do método de osteossíntese e no tipo de estabilidade necessária para que a consolidação ocorra no tempo esperado. Conhecimento da teoria do *strain* é mandatório para a formação de cirurgiões ortopédicos (MACEDO, *et al.*, 2018)

Quanto maior a energia do trauma, maiores serão os danos ósseos e de partes moles que perturbarão a vascularização local. Fraturas expostas são, geralmente, fruto de trauma de alta energia e lesam a vascularização do foco fraturário. Outra causa importante de comprometimento da vascularização é a redução aberta com descolamento excessivo do periósteo e lesão do suprimento sanguíneo do osso e tecidos moles durante a manipulação e inserção do implante (DEBIEUX *et al.*, 2010).

Infecção exclusiva não causa falta de união. No entanto, ela aumenta a predisposição, ao criar os mesmos fatores que causam pseudoartrose em fraturas não infectadas (por exemplo, sequestro formado pela morte de osso cortical, criação de espaços pela osteólise e movimentação pelo afrouxamento dos implantes). Haverá consolidação se o osso sequestrado permanecer absolutamente estável enquanto durar o processo de revascularização cortical (GUSTILO *et al.*, 1976).

Diabetes melito, hanseníase, siringomielia, disrafismo espinhal, paraplegia e alcoolismo crônico podem afetar a propriocepção protetora, limitando a capacidade do paciente de controlar a carga, o que pode comprometer a consolidação da fratura, pela instabilidade surgida (DEBIEUX *et al.*, 2010).

Por fim, o perfil psicológico do paciente é fator importante na decisão sobre as diversas linhas de tratamento das fraturas. O paciente e o médico devem trabalhar juntos para garantir o resultado. Dieta inapropriada, tabagismo, graduação da carga e problemas comportamentais devem ser abordados antecipadamente (KATO *et al.*, 2009)

2.6. Classificação da Pseudoartrose

Diversas são as classificações para as pseudoartroses; umas têm como norma a presença ou não de infecção, outras estabelecem a tática para o tratamento como guia na sua concepção, como as de Ilizarov e Catagni. Ainda existem as que se baseiam na fisiopatologia da lesão, a exemplo da classificação de Cech e Weber. Esta última, bastante utilizada, pois permite chegar a etiopatogenia do distúrbio de consolidação, permitindo melhor critério na busca da opção terapêutica. Nesse contexto, as pseudoartroses dividem-se em 2 grandes grupos (Figura 5):

1 - Pseudoartroses viáveis ou hipervasculares (hipertróficas)

Quando há formação de calo ósseo cartilaginoso de volume variável. Podem ser sub classificadas em:

- a) Pata de elefante – seguem-se a uma fixação ineficiente ou apoio precoce em uma fratura reduzida cujos fragmentos são estáveis;
- b) Casco de Cavalo - apresentam calo ósseo moderado, típica em fixações realizadas com placas e parafusos com instabilidade residual;
- c) Oligotróficas – há calo ósseo discreto e ocorrem usualmente quando a um grande desvio da fratura, diástase no foco ou fixação interna sem aposição exata dos fragmentos.

2 - Pseudoartroses inviáveis ou avasculares (atróficas)

Quando não há formação de calo ósseo, demonstrando a carência de potencial biológico para a reparação da lesão óssea. São sub classificadas em:

- a) Em cunha de torção – há um fragmento intermediário, com pouca ou nenhuma irrigação sanguínea. É típico em fraturas da diáfise tibial tratadas com placas e parafusos;
- b) Multifragmentária - há um ou mais fragmentos necrosados sem formação de calo ósseo, muitas vezes determina a quebra de implante utilizada na fixação da fratura;
- c) Por falha óssea ou segmentar - caracterizada pela perda de um segmento da diáfise do osso. As extremidades dos fragmentos são viáveis, mas a consolidação é impossível pela diástase. Com o tempo, os fragmentos tornam-se atróficos. É comum após fraturas expostas, ressecção de tumores e sequestrectomia na osteomielite;
- d) Atrófica – é o resultado final da ausência de fragmentos intermediários substituídos por tecido cicatricial, sem potencial osteogênico (LAVELLE, 1998)

Figura 5. Alguns tipos de pseudoartrose



Fonte: SIZÍNIO, *et.al.*, 2013

2.7. Tratamento das pseudoartroses

Estabelecer a etiopatogenia das pseudoartroses é importante na definição da técnica para tratamento. Na presença de pseudoartrose viável, o alinhamento dos fragmentos para garantir a continuidade do osso, associado à osteossíntese estável é suficiente para consolidação. Já o tratamento de pseudoartroses inviáveis necessita de procedimentos adjuvantes, como a decorticação e a enxertia óssea, que visam garantir aporte biológico a lesão óssea (KOJIMA, 2008).

O tratamento das fraturas agudas de ossos longos dos membros inferiores, que geralmente ocorrem no segmento diafisário, tem como indicação primária o tratamento cirúrgico com uso de hastes intramedulares. Quando a fratura primariamente tratada com haste intramedular evolui para pseudoartrose a indicação de substituição por uma haste fresada, 2 ou 3mm maior que o canal medular, é a melhor opção.

Outra opção de tratamento é a técnica da dinamização, que consiste na retirada do parafuso de bloqueio estático, mantendo exclusivamente o parafuso de bloqueio dinâmico para permitir a formação de calo ósseo no foco de fratura. Este é um procedimento de baixo grau de morbidade e baixo custo, sendo eficiente quando as lesões são viáveis.

As placas e parafusos permanecem amplamente indicadas no tratamento de pseudoartroses e possibilitam a ressecção dos fragmentos ósseos necróticos e as associações de táticas com objetivo de osteoindução, como a aposição de enxerto ósseo ou a decorticação (JUDET, 1972).

A fixação externa para tratamento de pseudoartrose também se constitui numa possibilidade terapêutica, assim como qualquer outro meio de osteossíntese que produza estabilidade entre os fragmentos ósseos. Os fixadores lineares monolaterais tendem a ser menos volumosos e menos pesados que os fixadores circulares. No entanto são menos estáveis e têm menos recursos para correção progressiva de deformidades (MERCADANTE, 2003).

O método de fixação externa circular proposto pelo ortopedista soviético Ilizarov é entendido como a melhor técnica de tratamento em pseudoartroses mais complexas (Figura 6). A montagem dos fixadores externos circulares

estáveis elimina a dor e permite mobilidade articular, com apoio dos membros de carga, estimulando o trofismo ósseo dos segmentos remanescentes, enquanto é possível a formação de regenerado ósseo (MERCADANTE, 2003).

Figura 6. Tratamento operatório com fixador externo circular: a) Observação do foco da pseudoartrose com osso necrótico b) Tratamento com fixador externo de Ilizarov.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A decorticação é utilizada para aumentar a resposta biológica, criando um leito vascularizado. Trata-se de técnica com aplicação diafisária, pois, quando feita na área metafisária, pode levar à restrição da função articular. Deve ser realizada de forma circunferencial ao redor da diáfise, para permitir a correção das deformidades axial e rotacional, sem promover a desvascularização local (SIZÍNIO *et al.*, 2013).

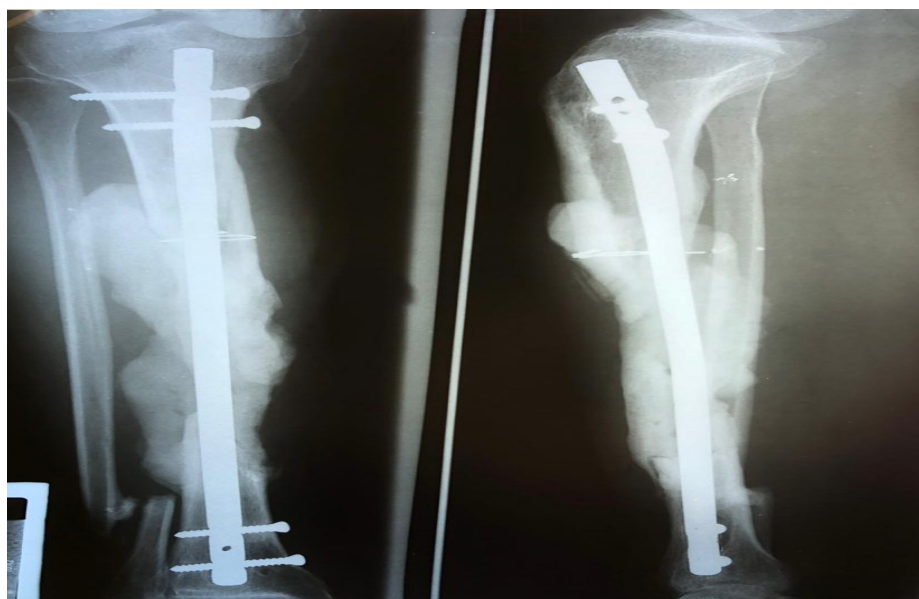
O autoenxerto esponjoso é biologicamente superior ao aloenxerto e aos substitutos ósseos disponíveis atualmente, uma vez que tem as vantagens de ser osteogênico (fonte de células viáveis), osteoindutor (recrutamento de células mesenquimais locais) e osteocondutor (andaime para crescimento de osso neoformado). As áreas doadoras mais utilizadas são a crista ilíaca posterior (maior fonte), a anterior, o grande trocânter, o fêmur distal e a tíbia proximal. Como desvantagens do auto enxerto esponjoso estão as morbidades relacionadas com a sua coleta, como dor e perda sanguínea. A proteína morfogenética óssea tem sido bastante estudada e sua aplicação tem crescido no tratamento das pseudoartroses difíceis, com perdas de segmentos ósseos. (HERNIGOU *et al.*, 2005)

A estimulação elétrica ou eletromagnética é uma forma possível de tratamento quando há contra indicação cirúrgica. A estimulação elétrica é realizada por meio invasivo quando o eletrodo é implantado cirurgicamente ou semi invasivo quando o eletrodo é colocado de forma percutânea. A estimulação por campo eletromagnético pulsátil proposta por Basset, conhecida como PEMF (pulsating electromagnetic field) é um método não invasivo que aumenta a chance de consolidação da pseudoartroses, porém requer imobilização e impede o apoio do membro por períodos prolongados, o que dificulta a reabilitação. Diástase maior que 01 cm contraindicam este tratamento (BASSETT *et al.*, 1981)

Outro método utilizado em casos de perda óssea segmentar maior que 6 cm é o enxerto ósseo vascularizado. Geralmente, as áreas doadoras preferenciais são fíbula e da crista ilíaca. São mais adequados para o úmero e o antebraço devido ao seu diâmetro limitado. Na tíbia, deve-se considerar a enxertia dupla (WALKER *et al.*, 2018).

Outra técnica bastante utilizada no tratamento de fraturas de diáfise tibial é a reconstrução das perdas segmentares da diáfise pela membrana induzida (Figura 7). Esse procedimento permite grandes reconstruções com uso de auto enxerto ósseo não vascularizado (MASQUELET, *et al.*, 2011).

Figura 7. Técnica de Masquelet: a) Incidência radiográfica da tíbia em Ap. b) incidência radiográfica da tíbia em Ap.



Fonte: Elaborada pelo autor.

2.8. Terapia com células tronco

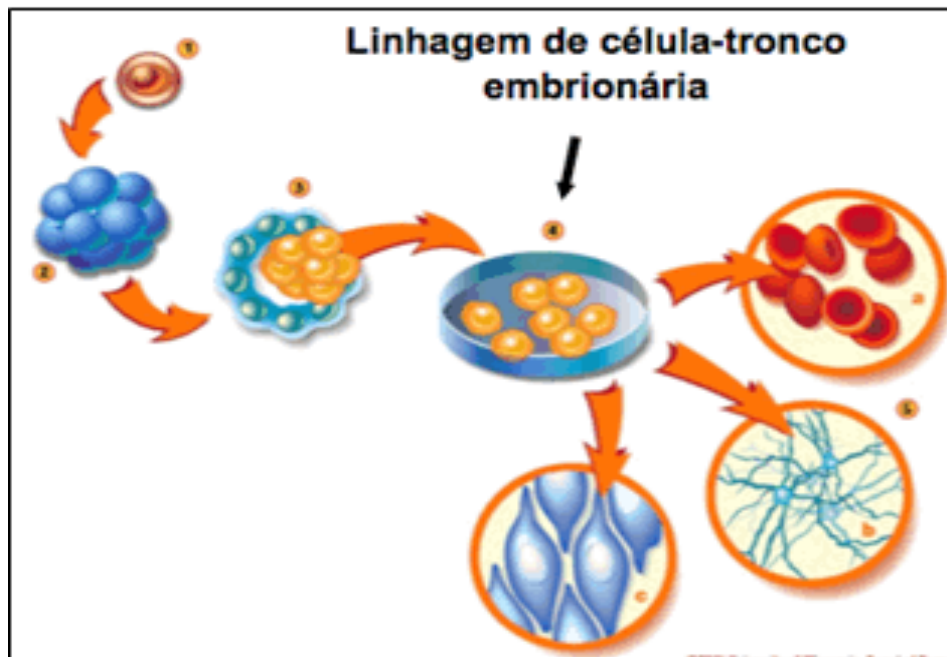
As células-tronco são células indiferenciadas, caracterizadas pela capacidade de autorenovação, diferenciação em diversos tipos celulares e reconstituição funcional de determinados tecidos. Didaticamente, são divididas em dois tipos principais: embrionárias e adultas (KRAMPERA *et al.*, 2007).

As células-tronco embrionárias para terapia podem ser derivadas da massa interna do blastocisto ou do zigoto (KRAMPERA *et al.*, 2007). As primeiras possuem capacidade ilimitada de autorenovação e são pluripotentes (capazes de se diferenciar em qualquer linhagem derivada dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma). Já as células com origem a partir do zigoto são classificadas como totipotentes, pois, além de se diferenciar nas células dos três folhetos embrionários, originam os tecidos extraembrionários. Em contraste, as células-tronco adultas aparentemente têm capacidade de autorenovação limitada e são denominadas multipotentes, pela capacidade limitada de diferenciação em poucos tipos celulares. (LE BLANC *et al.*, 2003)

As células estromais da medula óssea foram primeiramente descritas como células progenitoras ósseas presentes em sua fração estromal (GANGJI *et al.*, 2004). Estudos subsequentes demonstraram que essas células possuíam a capacidade de se diferenciar em linhagens celulares mesodérmicas, incluindo condrócitos, osteoblastos, adipócitos e mioblastos. Com base nessa capacidade de diferenciação em multilinhagens, Caplan em 1991, introduziu o termo célula-tronco mesenquimal (CAPLAN, 1991).

As células-tronco mesenquimais representam uma rara subpopulação das células-tronco da medula óssea (< 0,01% das células mononucleares da medula óssea) que podem ser expandidas mitoticamente em meio de cultura (Figura 8). Em decorrência da facilidade em se dividir e proliferar, concluiu-se que as células-tronco mesenquimais seriam as células responsáveis pela manutenção e renovação dos tecidos mesenquimais adultos, incluindo tecido ósseo. Dessa maneira, até o momento, essas células representam a fonte mais promissora para regeneração e reparo de diversos tecidos celulares (MENESES *et al.*, 2016).

Figura 8. Modelo esquemático de diferenciação das células tronco mesenquimais



Atlas de anatomopatologia da UNICAMP, 2002, adaptado

Tradicionalmente, as células-tronco mesenquimais são isoladas a partir de células da medula óssea. Entretanto, elas também podem ser isoladas a partir do cordão umbilical, do tecido sinovial, do tecido adiposo e, em frequência extremamente menor, do sangue periférico de adultos (KITOH *et al.*, 2004).

A observação de que as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea poderiam ser ativadas com o objetivo de secretar citocinas e fatores de crescimento corrobora a ideia de que a principal função das células-tronco mesenquimais seria atuar na reposição de diferentes partes para o tecido mesenquimal. Essa observação foi utilizada para sugerir que as células-tronco mesenquimais poderiam ser utilizadas de forma terapêutica como células alogênicas, também chamadas "células universais", ou seja, células capazes de atuar no interior de qualquer hospedeiro. A fim de confirmar tal suposição, foi posteriormente documentado que as células-tronco mesenquimais expandidas em meio de cultura não expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II), apenas de classe I (MHC I), além de também não apresentarem moléculas coestimulatórias, tais como B7-1, B7-2, CD40 e CD40 ligante. Dessa maneira, as células-tronco mesenquimais não

podem atuar como células apresentadoras de antígenos e, assim, falham em ativar o sistema imunológico do hospedeiro (KATO *et al.*, 2009).

As células-tronco mesenquimais podem ser facilmente isoladas e rapidamente expandidas *ex vivo*. Sua atuação na restauração do tecido ósseo defeituoso ocorre por meio de diversos mecanismos. No principal deles, desencadeado após o transplante, essas células iniciam a produção de fatores de crescimento reparadores, objetivando a produção, localmente, de fatores de crescimento e citocinas. Além disso, elas podem suprimir a inflamação local e repor células danificadas. Por fim, essas células são capazes de contribuir para a criação de um ambiente favorável ao reparo de tecido ósseo. Por esses motivos, as células-tronco mesenquimais foram identificadas como células promissoras no tratamento das pseudoartroses (HERNIGOU *et al.*, 2005).

O termo célula-tronco mesenquimal é normalmente aplicado a preparados de células com a propriedade de serem plástico-aderentes, isoladas a partir da medula óssea ou outros tecidos, positivos para um painel de marcadores de membrana específico e que sejam aptos a se diferenciar em diversos tipos celulares sob condições específicas, tanto *in vitro* como *in vivo*. (CAPLAN, 1991).

A ampliação do uso das células-tronco mesenquimais e a posterior comparação dos resultados obtidos em diferentes grupos são afetadas pela falta de especificidade e padronização dos marcadores moleculares dessas células. A fim de solucionar tal problema, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy) propôs três critérios básicos para que se possa definir uma célula como sendo célula-tronco mesenquimal. Assim, as células-tronco mesenquimais devem ser: (1) plástico-aderentes caso mantidas em condições básicas de cultura; (2) positivas para CD105, CD73 e CD90 e negativas para CD45, CD34, CD14 e CD11b; e (3) capazes de se diferenciar em fibroblastos, osteoblastos, adipócitos e condroblastos quando expostas *in vitro* às linhagens correspondentes (KRAMPERA *et al.*, 2007).

Entretanto, tais critérios não parecem ser tão específicos das células-tronco mesenquimais. Por esse motivo, eles não são considerados importantes na caracterização das células-tronco mesenquimais, porém outras características devem ser definidas para se obter controle de qualidade adequado. A identificação de marcadores específicos pode facilitar o isolamento de uma população homogênea a partir de determinado material. Os marcadores

que têm sido utilizados para melhor seleção de células-tronco mesenquimais são STRO-1, CD271, CD73 (ecto-5'-nucleotidase, SH3 e SH4) e CD105 (endoglin, SH2). (TSE *et al*, 2003)

Diversos estudos demonstraram a capacidade de as células-tronco mesenquimais migrarem e se dirigirem para determinados órgãos e tecidos. (ALLERS *et al*, 2004) avaliaram a biodistribuição de células-tronco mesenquimais humanas após infusão venosa em ratos adultos não condicionados previamente. Nesse estudo, foi demonstrado que as células-tronco mesenquimais se dirigiram para a medula óssea, para o baço e para os tecidos mesenquimais desses animais. Outros estudos avaliaram a distribuição das células-tronco mesenquimais em outros órgãos após infusão venosa. Esses autores marcaram as células-tronco mesenquimais com proteína verde fluorescente e infundiram essas células em babuínos, após prévio condicionamento (irradiação letal e suporte hematopoiético) e sem condicionamento. Tanto as células-tronco mesenquimais alogênicas como as autólogas foram detectadas em diversos tecidos, com nível de fixação variando entre 0,1% e 2,7% (os animais sem condicionamento prévio apresentaram menores níveis de fixação). Tais dados corroboram a ideia de que as células-tronco mesenquimais participam da reposição celular em uma variedade de tecidos, preferencialmente em tecidos que sofreram injúria (KITOH *et al*, 2004).

3. OBJETIVO GERAL

Comparar o desfecho do método tradicional de tratamento da pseudoartrose da tíbia com até 2 centímetros de falha, realizado com o uso de fixador externo, haste ou placa e parafuso com o tratamento combinado do uso das técnicas convencionais e infiltração de células-tronco mesenquimais autólogas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. - Delineamento do estudo

Ensaio clínico randomizado, aberto, com cegamento dos grupos experimentais, com 18 pacientes diagnosticados com pseudoartrose asséptica hipertrófica da tíbia divididos em dois grupos: grupo controle, formado por 9 pacientes e grupo experimental, também com 9 pacientes.

A lista de alocação aleatória foi gerada utilizando software e a randomização foi mantida sob sigilo, ou seja, os investigadores primeiro incluíram o paciente no estudo e só após essa etapa, o tratamento (experimental ou controle) foi definido. O cegamento ocorreu conjuntamente com a aleatorização e representou o desconhecimento de todos envolvidos na pesquisa (participantes do estudo, investigadores, equipe médica, estatístico) quanto à alocação dos pacientes a um grupo ou a outro. Assim, o estudo não foi influenciado por alterações de conduta por parte da equipe médica ou do paciente. As soluções contendo injetável inócuo isolado e as que continham concentrado de células tronco mesenquimais foram acondicionadas em seringas para injeção. Ambas as soluções apresentavam aspectos visual e estrutural semelhantes, não permitindo a distinção a olho nu. Ortopedistas, pacientes e equipe diretamente envolvida no estudo, não souberam qual solução foi injetada nos participantes. Apenas a equipe diretamente ligada ao preparo do material a ser infundido sabia qual paciente recebeu solução inócua ou concentrado de células tronco.

4.2. Aspectos éticos

Todos os participantes desse estudo foram informados dos objetivos do projeto e, após explicação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) elaborado especialmente para esse fim. Dados clínicos e epidemiológicos foram coletados dos prontuários dos pacientes, quando disponíveis. Este estudo foi realizado em conformidade com os princípios da declaração de Helsinque e com os termos estabelecidos pela Resolução 466/12 que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos. O estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética local do Hospital Universitário Professor Edgard

Santos da Universidade Federal da Bahia (CEP-HUPES), parecer nºCAE: 72236317200000049.

Os dados utilizados estão registrados em base de dados eletrônica de acordo com as normas estabelecidas pelo Documento das Américas e pelo Manual de Boas Práticas Clínicas.

Os pacientes que foram alocados para o grupo controle foram submetidos a cirurgia convencional para estabilização da fratura, e foram acompanhados da mesma forma que os pacientes alocados para o grupo teste, de forma a garantir que todos os pacientes incluídos no projeto tivessem o mesmo tipo de acesso ao tratamento e cuidados dispensados pela equipe assistencial envolvida na pesquisa. Todos os resultados advindos da pesquisa têm um circuito garantido de informação à equipe médica responsável e atualização dos dados nos prontuários dos participantes e controle absoluto do sigilo de informações.

Este estudo não envolveu armazenamento de amostras biológicas e nem colaboração estrangeira. Esta pesquisa também não previu pedido de patente.

4.3. População de estudo e coleta de dados

A população de pacientes sob acompanhamento no Ambulatório da Ortopedia e Traumatologia do HUPES/UFBA é formada por 212 pacientes entre homens e mulheres de diferentes idades. Desse total, dezoito evoluíram com pseudoartrose asséptica hipertrófica da tíbia e foram incluídos nesse trabalho. Os dados clínicos referentes à(s) causa(s) do trauma, tratamentos prévios, comorbidades, intervenções cirúrgicas, entre outros, foram coletados dos prontuários médicos dos pacientes. Os dados epidemiológicos (sexo, idade, grau de escolaridade, estado civil, zona geográfica de moradia, etnia, renda familiar e profissão) foram coletados utilizando questionários de pesquisa elaborados especificadamente para esse estudo.

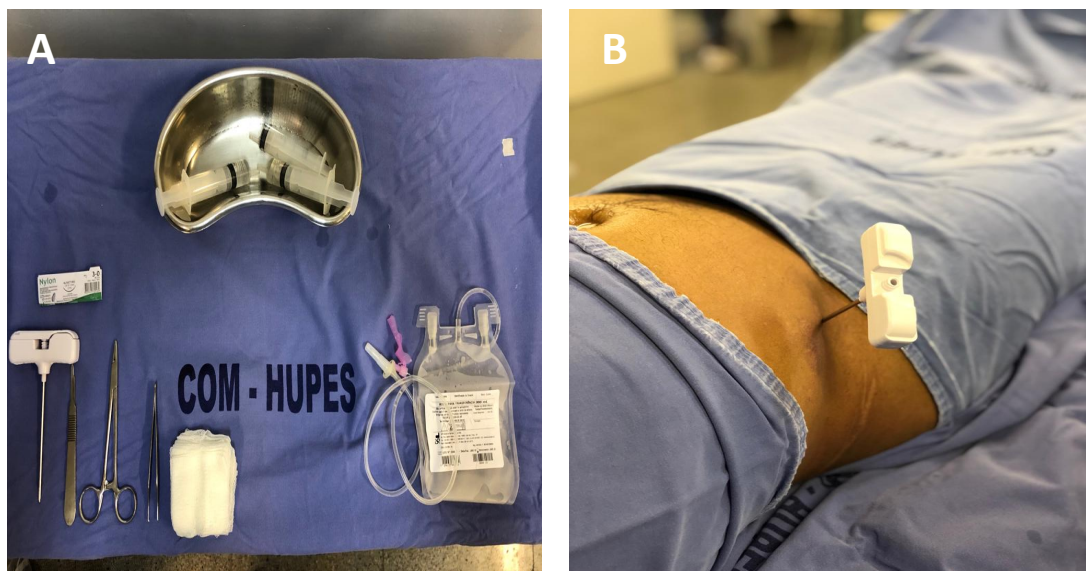
Foram excluídos do estudo pacientes que apresentavam infecção em sítio cirúrgico ou em outro foco, portadores de comorbidades que contraindicassem o procedimento cirúrgico, pacientes com tratamento prévio de pseudoartrose e que tivessem qualquer condição clínica que impossibilitasse a inclusão do mesmo no estudo.

4.4. Obtenção da amostra biológica para separação de Célula Tronco

Os experimentos e ensaios foram realizados com 18 amostras biológicas obtidas em procedimentos cirúrgicos de punção de medula óssea (MO) conduzidos no Complexo-Hospital Universitário Professor Edgar Santos (C-HUPES), na cidade de Salvador-BA, no mesmo tempo da cirurgia ortopédica dos participantes desse estudo. Os pacientes alocados no grupo controle também foram submetidos à punção medular para cegamento de procedimento.

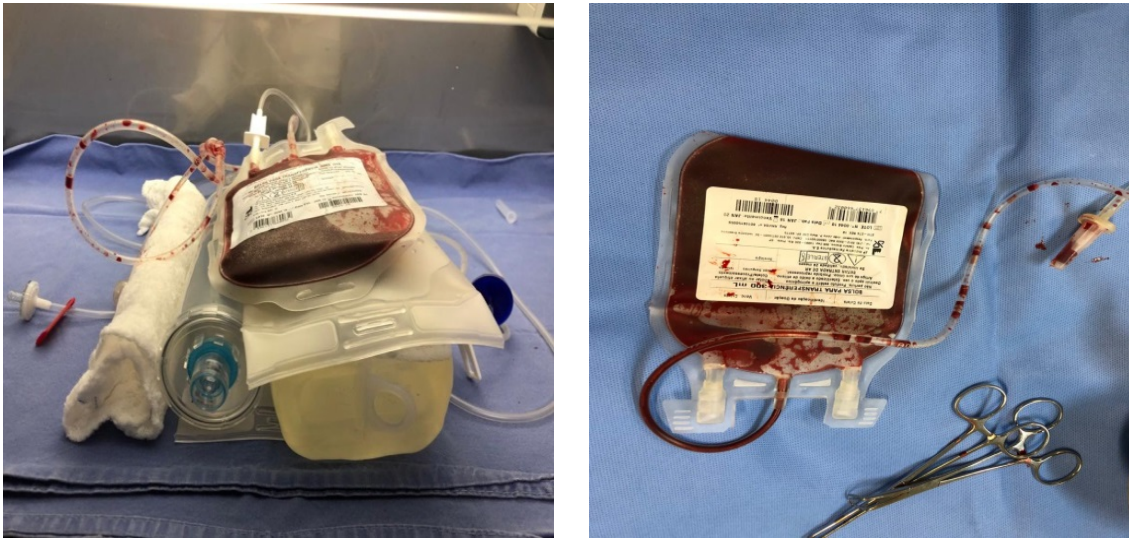
O procedimento de aquisição de células tronco mesenquimais foi realizado com o paciente em centro cirúrgico, sob anestesia, posicionado em decúbito dorsal e horizontal e com realização de antissepsia e assepsia do membro inferior acometido e da região ilíaca ipsilateral. Uma pequena incisão sobre a pele da crista ilíaca foi feita para introdução de agulha do tipo Jamshidi (Figura 9 B). A punção e aspiração da medula óssea deu-se através deste acesso.

Figura 9. Punção de aspiração de medula: A – Materiais cirúrgicos utilizados na coleta. B – Punção na crista ilíaca do paciente.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 10. Imagens do material coletado



Fonte: Elaborada pelo autor

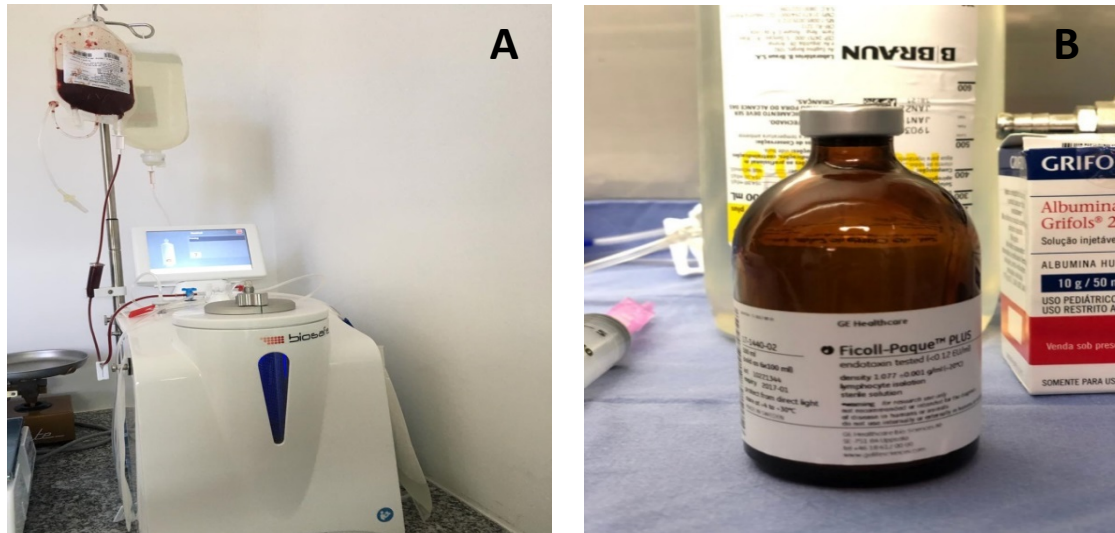
Após a punção o aspirado foi alocado em um separador de células (SEPAX, Biosafe, Suíça, Figura 11), constituído por uma centrífuga e um dispositivo de dupla câmara descartável que forneceu aproximadamente 40 mL de concentrado contendo células mononucleares de medula óssea após, aproximadamente, sessenta minutos de centrifugação múltipla, de acordo com a recomendações do fabricante.

No momento da injeção, a pele foi perfurada na região da pseudoartrose.

Por intermédio dessa perfuração única na pele, guiada por radiografia, foi possível posicionar a agulha, tanto no local de não união quanto na superfície medial, lateral e posterior do osso (Figura 12).

Para todos os pacientes foi mantida a fixação primária e não foi permitida a sustentação de peso durante os primeiros 30 dias após o procedimento, a fim de evitar a interferência mecânica no processo de regeneração dos tecidos e cicatrização óssea

Figura 11. Imagem da SEPAX (A) e das substâncias químicas (B) utilizadas na separação de células troncos mesenquimais



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 12. Imagem da infusão de células tronco na tíbia



Fonte: Elaborada pelo autor

4.5. Avaliação dos resultados das técnicas utilizadas no tratamento

Todos os pacientes selecionados para participar dessa pesquisa tiveram a pseudoartrose, o retardo de consolidação e/ou fraturas complexas não infectadas documentadas por radiografia antes da realização da intervenção cirúrgica. Para acompanhamento e avaliação dos resultados pós-cirúrgicos foram realizados exames radiográficos seriados, nos intervalos de 1, 3 e 6 meses após a intervenção cirúrgica. Durante o acompanhamento ambulatorial, pós-operatório, os pacientes foram submetidos a avaliação da escala analógica visual da dor. O critério utilizado para avaliação e comparação dos resultados encontrados no grupo teste e grupo controle foi a avaliação do exame de radiografia da perna operada, nas incidências em AP e perfil. Neste exame foi verificado as imagens de consolidação completa da fratura, de formação de ponte óssea ou de não consolidação da fratura

4.6. Análise estatística

Foi realizada a análise estatística descritiva comparativa. Adicionalmente uma análise estatística foi realizada utilizando-se os softwares SPSS versão 18 e GraphPad versão 6, ambos para Windows. Todos os dados estão apresentados em tabela com média e desvio padrão. O nível de significância adotado para este estudo foi de 5%. Foi realizado o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos entre si. As correlações não paramétricas foram feitas pelo teste de Spearman adotando-se intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil sócio demográfico dos participantes dessa casuística encontra-se representado na tabela 1. Do total de 18 pacientes que integram esse estudo, 14 (77,8%) são homens e 4 (22,2%) mulheres. A idade média do grupo foi de 38,3 anos e a maioria se autodeclarou pardo ou negro. O nível de escolaridade mostrou-se baixo, com 72% dos participantes não tendo concluído o Ensino Médio.

Tabela 1. Perfil epidemiológico dos grupos teste e controle

Características	Total (n = 18)	Grupo Teste (n = 9)	Grupo Controle (n = 9)
Gênero			
Feminino	4 (22,2%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)
Masculino	14 (77,8%)	7 (77,8%)	7 (77,8%)
Idade (anos)	38.3 (09 - 74)	43.4 (35 - 59)	33.3 (09 - 74)
Etnia			
Pardo	10 (55,5%)	2 (22,2%)	8 (88,8%)
Negro	6 (33,3%)	5 (55,6%)	1 (11,2%)
Branco	2 (11,1%)	2 (22,2%)	0 (0,0%)
Escolaridade			
Não Alfabetizado	1 (5,5%)	0 (0,0%)	1 (11,2%)
Ensino Fundamental Incompleto	2 (11,0%)	1 (11,2%)	1 (11,2%)
Ensino Fundamental Completo	6 (33,3%)	2 (22,2%)	4 (44,2%)
Ensino Médio Incompleto	4 (22,2%)	3 (33,3%)	1 (11,2%)
Ensino Médio Completo	5 (27,7%)	3 (33,3%)	2 (22,2%)

Assim como os resultados encontrados nesse estudo, a maior prevalência dos condutores do sexo masculino em acidentes tanto fatais como não fatais tem sido atestada por vários estudos, tendo em vista a maior exposição masculina ao risco. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), os homens representam mais de 77% das vítimas de trauma no trânsito. Além da predominância masculina entre as vítimas de acidentes de trânsito, verifica-se também padrão etário jovem dos envolvidos nessas ocorrências. No nosso estudo, a média de idade dos pacientes com fratura de tíbia foi de 38,3 anos. Esses jovens representam parte da população em idade ativa do Brasil, o que

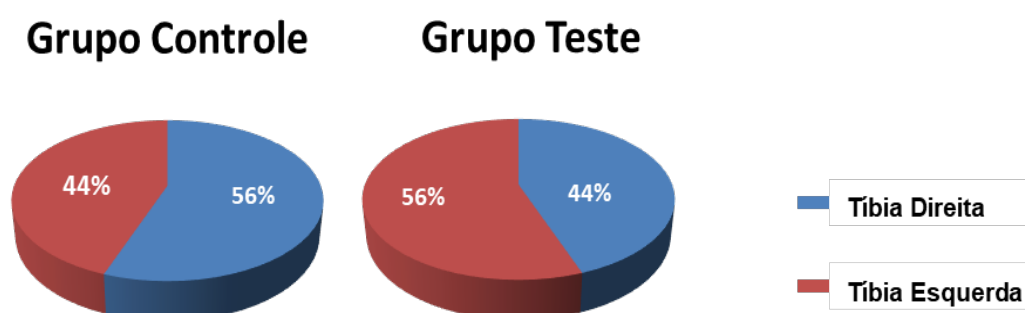
significa impactos negativos na economia por perder mão de obra e contribuintes para a Previdência Social.

Estudos prévios encontraram associação entre ocorrência de acidentes de trânsito e baixa escolaridade, uma vez que menores níveis de instrução podem significar também condições insuficientes de conscientização e conhecimento ao dirigir (REZENDE *et al.*, 2008). Porém, cabe ressaltar que a escolaridade pode ser um reflexo das condições socioeconômicas do indivíduo, sendo possível, portanto, que a associação entre acidentes de trânsito e menores níveis de instrução seja fruto da maior exposição desses indivíduos a situações que favorecem a ocorrência desses eventos (ARRUDA *et al.*, 2009).

No que se refere à raça/cor, que também pode manter relação com a condição social do indivíduo, estudos para localidades do Brasil têm encontrado relação entre raça/cor e ocorrência de acidentes de trânsito, sendo os maiores riscos para indivíduos autodeclarados pretos ou pardos. Esses resultados têm sido explicados por alguns autores como uma reprodução das desigualdades socioeconômicas por raça/cor existente no Brasil, em que as condições socioeconômicas desfavoráveis da população negra se perpetuam e se manifestam também no campo da saúde, como a maior exposição às causas externas de morbimortalidade.

A Figura 13 mostra a relação entre a porcentagem das fraturas em fíbula esquerda e direita nos participantes do grupo teste e grupo controle.

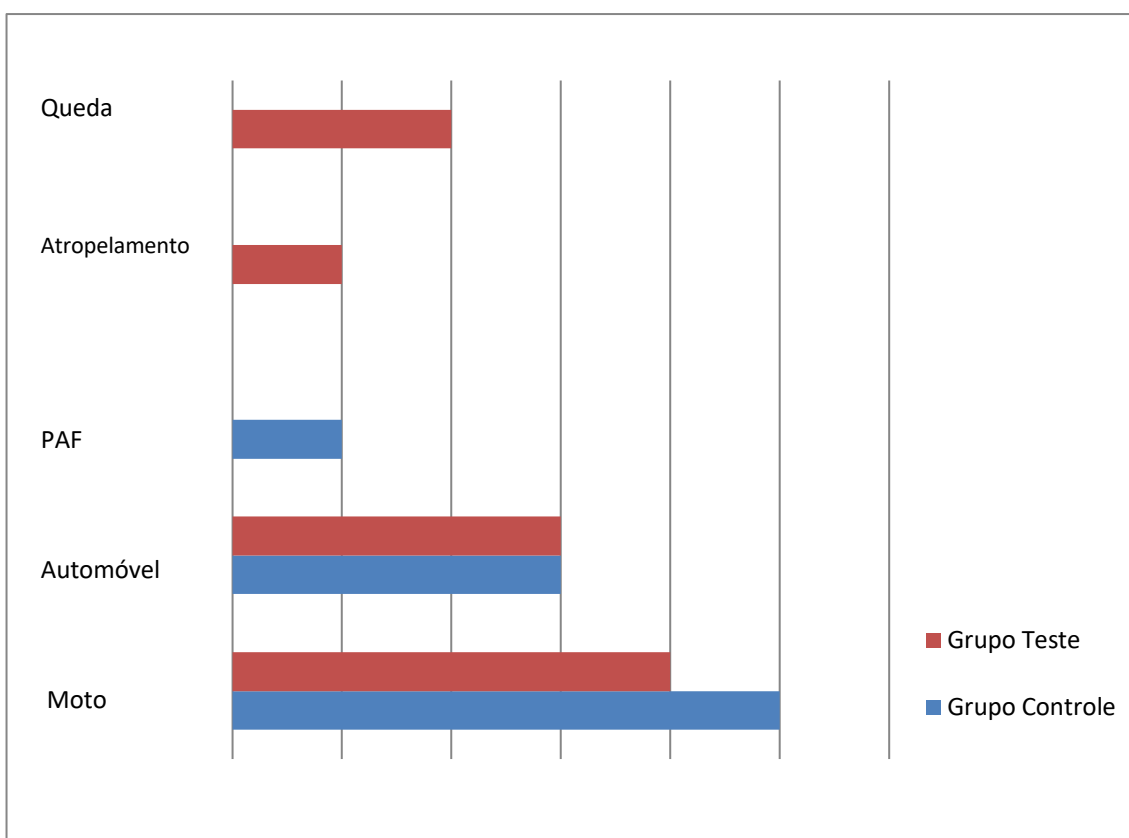
Figura 13. Percentagem de fratura em tíbia direita e esquerda nos participantes do grupo teste e grupo controle.



Fonte: Elaborada pelo autor

A avaliação das causas de fraturas entre os participantes (Figura 14), revelou que em ambos os grupos (controle e teste) a maioria foi provocada por acidente envolvendo veículos de duas rodas (motocicletas), sendo 55,5 % no grupo controle e 44,4% no grupo teste. Quando analisados em conjunto, quer seja: acidentes envolvendo qualquer tipo de veículo em ambos os grupos, dos 18 participantes 15 (83,3 %) tiveram as fraturas relacionadas a acidentes de trânsito. Dados semelhantes foram identificados no estudo de Debieux *et al.*, (2010).

Figura 14. Comparação das causas de fratura de tíbia entre os grupos teste e controle.



Fonte: Elaborada pelo autor

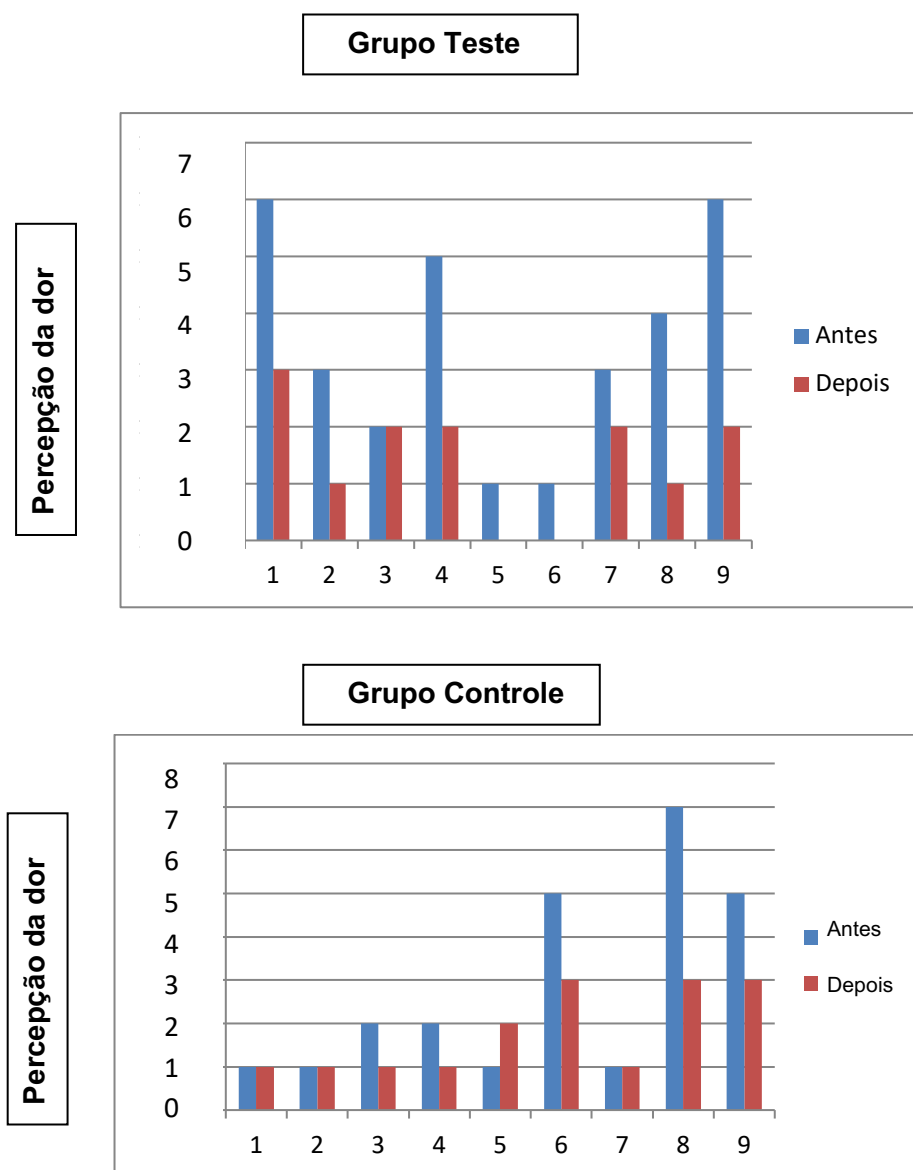
O quadro 1 relaciona dados do ato cirúrgico e o desfecho por paciente participante da pesquisa. Em 55,5% dos pacientes (10 de 18) foram utilizados placas e parafusos para fixação óssea. Cinco pacientes foram tratados com uso de haste metálica e apenas três tiveram a colocação de fixador externo.

Quadro 1. Dados do procedimento cirúrgico por paciente participante da pesquisa

	Paciente	Idade	Material Cirúrgico	Uso de Antibiótico	Tempo de Pseudoartrose (meses)	Tempo Cirúrgico (em minutos)	Desfecho
Controle	1	74	Placa e Parafuso	Sim	9	180	Não consolidou
Controle	2	48	Placa e Parafuso	Sim	12	145	Não consolidou
Controle	3	26	Haste	Sim	15	121	Ponte
Controle	4	36	Haste	Sim	9	90	Ponte
Controle	5	16	Placa e Parafuso	Sim	20	95	Consolidou
Controle	6	38	Placa e Parafuso	Sim	25	180	Não consolidou
Controle	7	23	Fixador Externo	Sim	13	200	Não consolidou
Controle	8	9	Placa e Parafuso	Sim	15	175	Ponte
Controle	9	30	Fixador Externo	Sim	21	182	Não consolidou
Teste	10	56	Placa e Parafuso	Sim	12	95	Consolidou
Teste	11	37	Haste	Sim	9	200	Consolidou
Teste	12	42	Haste	Sim	14	198	Ponte
Teste	13	48	Placa e Parafuso	Sim	16	140	Ponte
Teste	14	42	Placa e Parafuso	Sim	12	120	Consolidou
Teste	15	35	Placa e Parafuso	Sim	9	110	Consolidou
Teste	16	37	Placa e Parafuso	Sim	9	100	Consolidou
Teste	17	59	Fixador Externo	Sim	13	130	Consolidou
Teste	18	35	Haste	Sim	20	80	Ponte

Na prática clínica, o uso da escala analógica de dor é um marcador validado para aferir qualidade de vida e permite que o próprio paciente classifique o status algíco de acordo com sua auto percepção. Nessa casuística, todos os participantes foram orientados a identificar a intensidade da sua dor numa escala analógica graduada entre 0 (ausência de dor) e 10 (dor mais forte sentida pelo mesmo). O teste foi aplicado antes do procedimento cirúrgico e no “end point” do estudo. O resultado encontra-se representado na Figura 15.

Figura 15. Gráfico comparativo da percepção da intensidade da dor pelos pacientes do grupo teste e grupo controle antes e depois do procedimento cirúrgico.



Fonte: Elaborada pelo autor

Todos os participantes do grupo teste (100%) referiram melhora da dor após o procedimento cirúrgico. Desses, dois pacientes (paciente 5 e 6) referiram remissão completa do quadro álgico. Apenas um paciente (paciente 3) referiu manutenção na intensidade da dor após tratamento. Importante ressaltar que esse paciente não teve a fratura totalmente consolidada ao final do seguimento, Entre os pacientes do grupo controle, a percepção da melhora da dor após o procedimento terapêutico sofreu menos variação quando comparado aos pacientes do grupo teste. Três participantes (pacientes 1, 2 e 7) referiram não ter percebido nenhuma melhora e um participante (paciente 5) referiu piora do quadro álgico após o procedimento cirúrgico.

Esses resultados sugerem que a técnica de enxertia autóloga de células da medula óssea combinada com tratamentos convencionais nas pseudoartrose de tíbia auxilia não apenas na consolidação da fratura, mas também contribui para redução dos sintomas álgicos. Novas investigações sobre os processos bioquímicos e imunológicos envolvendo enxertia de células tronco no tratamento de pseudoartrose poderão oferecer novas percepções para a pesquisa clínica.

A Tabela 2 compara os parâmetros cirúrgicos do grupo teste e grupo controle. O tempo de doença (pseudoartrose) e o tempo cirúrgico não se mostraram estatisticamente significante quando comparado os dois grupos. Importante ressaltar que estudos na área cirúrgica reconhecem o impacto do tempo de procedimento na evolução clínica do paciente, pois está relacionado a maior probabilidade de intercorrências, a exemplo: infecções, queda do estado geral do paciente, alterações hidroeletrólíticas, entre outros.

O material cirúrgico utilizado também pode influenciar no desfecho clínico, pois está imbricado na ativação de fatores estimuladores e imunológicos que podem alterar o curso natural da convalescência. Estudos têm evidenciado que fatores ligados ao próprio organismo e o próprio ato cirúrgico são cruciais para os desfechos clínicos de uma abordagem cirúrgica (APARECIDA *et al.*, 2009, HERNIGOU *et al.*, 2008)

Tabela 2. Relação dos parâmetros cirúrgicos entre o grupo teste e o grupo controle

Característica	Total (n = 18)	Grupo Teste (n = 09)	Grupo Controle (n = 09)	P Valor
Gênero				
Mulher	4 (22,2%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	
Homem	14 (77,8%)	7 (77,8%)	7 (77,8%)	
Idade	38,3 (09 - 74)	43,4 (35 - 59)	33,3 (09 - 74)	0,1056
Material Cirúrgico				
Placa e Parafuso	10 (55,5%)	5 (55,5%)	5 (55,5%)	
Haste	4 (22,2%)	3 (33,3%)	2 (22,2%)	
Fixador Externo	4 (22,2%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)	
Tempo de Doença (meses)	14,05 (9-25)	12,6 (9-20)	15,4 (9-25)	0,325
Tempo Cirúrgico (minutos)	141,1 (80-200)	130,3 (80-200)	152 (90-200)	0,606
Desfecho				
Não consolidou	5 (9-34,0)	0 (0,0%)	5 (55,5%)	
Ponte	6 (10-23,0)	3 (33,3%)	3 (33,3%)	
Consolidou	7 (8-20,0)	6 (66,7%)	1 (11,1%)	

Em relação ao desfecho clínico, pacientes tratados com a combinação de técnicas convencionais associadas à enxertia autóloga de células tronco mesenquimais foram mais favoráveis e, quando comparados com o grupo controle. Todos os pacientes do grupo teste tiveram as fraturas consolidadas ou parcialmente consolidadas (formação de pontes). Em relação ao grupo controle, a maioria dos pacientes (cinco dos nove) permaneceu com fratura não consolidada. Esses achados estão de acordo com estudos prévios que evidenciaram uma melhora significativa no processo de consolidação de fraturas quando os pacientes eram submetidos a enxertia autóloga de células troncos (HERNIGOU *et al.*, 2008)

6. Considerações Finais

Nesse estudo, o uso de células tronco mesenquimais associado a técnicas cirúrgicas clássicas para consolidação de pseudoartrose de tibia mostrou-se capaz de interferir no desfecho clínico e melhorar as condições dos pacientes submetidos a essa nova abordagem terapêutica. Os resultados obtidos nessa casuística sugerem que novos estudos com uso terapêutico de células tronco mesenquimais podem ser úteis para o entendimento da fisiopatologia da pseudoartrose de tibia e pode constituir-se em valiosa ferramenta de tratamento de diversas patologias.

7. Referências

AKENO, N.; ROBINS, J.; ZHANG M, CZYZYK-KRZESKA, M.F.; CLEMENS, T.L. Induction of vascular endothelial growth factor by IGF-I in osteoblast-like cells is mediated by the PI3K signaling pathway through the hypoxia-inducible factor-2alpha. **Endocrinology**. v.143, p. 420-425, 2002.

ALLERS, C.; SIERRALTA, W.D.; NEUBAUER, S.; RIVERA, F.; MINGUELL, J.J.; CONGET, P.A. Dynamic of distribution of human bone marrow derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. **Transplantation**. v. 78, n. 4, p. 503-508, 2004.

APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V.; GUASTALDI, A. C. Biomimetic apatite formation on ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 6, p. 1215-1222, 2009.

BASSET C.A. et al. Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. **J. Bone Joint Surg. Am.** v. 63: p. 511-523, 1981.

BIANCO P.; ROBEY P.G.; SIMMONS P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**. v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008.

CAPLAN A.I. Mesenchymal stem cells. **J. Orthop. Res.** v.9, p. 641-650, 1991.

CHAMLIAN, T. R., Uso de Próteses em Amputados de Membros Inferiores por Doença Arterial Periférica, **Einstein**, vol. 12, n. 4, São Paulo, Brasil, 2014.

DEBIEUX, P. et al. Lesões do aparelho locomotor nos acidentes com motocicleta. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 6, p. 353-356, 2010.

GANGJI, V.; HAUZEUR, P. J.; MATOS, C.; MAERTELAER, V.; TOUNGOUZ, M.; LAMBERMONT, M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. **J. Bone Joint Surgery Am.**, v. 86, p.1153-1160, 2004.

GIGLIO, P.N. et al. Avanços no tratamento das fraturas expostas. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 2, p. 125-130, 2015.

GRANDI, J.E; ELIAS, N.; SKAF, A.Y. Fratura diafisária fechada de tíbia no adulto. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.7, p. 1-3, 2007.

GUSTILO, R. B.; ANDERSON, J. T. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. **The journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**. v. 58, n. 4, p. 453-458, 1976.

HAMILL, J.; KNUTZEN, K.M. Bases biomecânicas do movimento humano. 3. ed. Barueri, SP: **Manole**, p. 69-73, 2011.

HEBERT, S.K. et al. **Ortopedia e Traumatologia**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, v. 1, 2017.

HERNANDEZ-FERNANDEZ, A. et al. Effect of administration of platelet-rich plasma in early phases of distraction osteogenesis: An experimental study in an ovine femur model. **Injury**, v. 44, n. 7, p. 901-907, 2013.

HERNIGOU, P.H. et al. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for non-unions: influence of the number and concentration of progenitor cells. **J.B.J.S**, v. 87, n. 7, p. 1430-1437, 2005.

HERNIGOU, P.; DALTRO, G. C.; FILLIPINI, P.; MUKASA, M. M.; MANICOM, O. Percutaneous Implantation of Autologous Bone Marrow Osteoprogenitor Cells as Treatment of Bone Avascular Necrosis Related to Sickle Cell Disease. **The Open Orthopaedics Journal**. v. 2, p. 62-65, 2008.

HOPPENFELD, S.; MURTHY, V. L. Tratamento e reabilitação de fraturas. Barueri, SP: Manole, 2001.

HUNG, S. P.; HO, J.H.; SHIH, Y. V.R.; LO, T.; LEE, O. K. Hypoxia Promotes Proliferation and Osteogenic Differentiation Potentials of Human Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Orthopaedic Research**. v.30, p. 260-266, 2011.

JUDET R.; PATEL, A. Décortication ostéo-musculaire: révision de 1150. **Cas. Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar**. v.58: 147-150, 1972.

KATO, G. J.; HEBBEL, P. R.; STEINBERG, H. M.; GLADWIN, T. M. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **British Journal of Haematology**. v. 129, p. 465-481, 2009.

KARP JM, LENG T.G.S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell Stem Cell**. v.4, n. 3, p. 206-216, 2009.

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.

KITAORI, T.; ITO, H.; SCHWARZ, E.M.; TSUTSUMI, R.; YOSHITOMI, H.; OISHI, S.; NAKANO, M.; FUJI, N.; NAGASAWA, T.; NAKAMURA, T. Stromal Cell-Derived Factor 1/CXCR4 Signaling Is Critical for the Recruitment of Mesenchymal Stem Cells to the Fracture Site During Skeletal Repair in a Mouse Model. **Arthritis & Rheumatism**. v. 60, n.3, p. 813-823, 2009.

KITOH, H. et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis: a preliminary result of three cases. **Bone**, v. 35, n. 4, p. 892–898, 2004.

KOJIMA, K. D. **Clínica ortopédica da SBOT**: novos conceitos em osteossíntese. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2008.

KRAMPERA, M.; FRANCHINI M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. **Blood Transfus.** v. 5, p. 120-129, 2007.

KUZNETSOV S.A.; MANKANI M.H.; GRONTHOS, S.; SATOMURA, K.; BIANCO P.; ROBEY P.G. Circulating skeletal stem cells. **J. Cell Biol.** v.153, n. 5, p.1133-1140, 2001

LABRONICI, P.J. et al. Treatment of the distal fractures of the tibia: shall we fix the fibula? **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, p. 23-27, 2011.

LE BLANC K, TAMMIK C, ROSENDAHL K, ZETTERBERG E, RINGDEN O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Exp. Hematol.** v.31, n.10, p.890-896, 2003.

MA, H. et al. A gross anatomic study of distal tibia and fibula for single-incision approach. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 9, n. 1, p. 1, 2014.

MACEDO, A.S. et al., Physics behind the implants used for high strain fractures: literature review. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 55, n. 1, p. 1-8, 2018.

MAITRA, B.; SZEKELY, E.; GJINI, K.; LAUGHLIN, M.J.; DENNIS, J.; HAYNESWORTH, S.E.; et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. **Bone Marrow Transplant.** v.33, n.6, p. 597-604, 2004.

MAHENDRA, A.; MACLEAN, A. D. Available biological treatments for complex non-unions. **Injury**, v. 38, p. S7-S12, 2007.

MASQUELET, A.; ROMANA, M.; WOLF, G. Skin island flaps supplied by the vascular axis of the sensitive superficial nerves: anatomic study and clinical experience in the leg. **Plast. Reconstr. Surg.** v.89, n.6, p. 1115-1121, 2011.

MENESES, J.V.L. et al. Autologous stem cell-based therapy for sickle cell leg ulcer: a pilot study. **British Journal of Haematology**, v. 175, n.5, p. 949-955, 2016.

MERCADANTE, M.T. et al. Estudo mecânico comparativo de quatro montagens de fixador externo monolateral submetidos à força de torção. **Ver. Brasileira de Ortopedia.** v. 38, p.106-116, 2003.

MOCHIZUKI, T.; YAMATODANI, A.; OKAKURA, K.; HORII, A.; INAGAKI, N. WADA, H. Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. **Physiol. Behav.** v. 51, p. 391-394, 2002.

- NETTER, F, Atlas de Anatomia Humana. 6. Ed. Brasil: Elsevier, v.1, 2015.
- NEUMANN, D. A. Cinesiologia do aparelho musculoesquelético. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- NICOLINI, A. P. et al. Tratamento das fraturas da diáfise dos ossos do antebraço em crianças e adolescentes. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 35-8, 2010.
- NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Biomecânica básica do sistema musculoesquelético**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- REZENDE, M. R. et al. Cobertura do terço distal da perna com retalhos de perfurantes pediculados. **Acta ortopédica Brasileira**, v. 16, n.4, p. 223-229, 2008.
- RHINELANDER, F.W. Tibial blood supply in relation to fractures healing. **Clin Orthop**. v. 105, p. 34-81, 1974.
- RHINELANDER, F.W. The vascular response of bone to internal fixation. In: Browner, B.D.; Edwards. CC., eds. **The Science and Practice of intramedullary nailing**. Philadelphia, Lea and Febiger, p. 25-29, 1987.
- RIBEIRO, F. R. et al. Resposta osteogênica sistêmica no estímulo medular ósseo. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 29-34, 2009.
- ARRUDA, R.P.L. et al. Fraturas expostas: estudo epidemiológico e prospectivo. **Acta ortopédica Brasileira**, v.17, n.6, 2009.
- STANDRING, S. **Gray's anatomy the anatomical basis of clinical practice**. Pdf. 41. Ed. New York: Elsevier Limited, 2016.
- SIZÍNIO, H. et al. Ortopedia e traumatologia: princípios e práticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. **Cadernos Unisuam**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 101-117, 2013.
- TRAFTON, J.A.; ABBADIE, C.; MAREK, K.; BASBAUM, A.I. Postsynaptic signaling via the [mu]-opioid receptor: responses of dorsal horn neurons to exogenous opioids and noxious stimulation. **Journal of Neuroscience**. v. 20, n.23, p. 8578–8584, 2000.
- TSE, W.T, PENDLETON J.D., BEYER WM, EGALKA MC, GUINAN E.C. Supression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**. v.75, n. 3, p. 389-397, 2003.
- WAJDI, B. et al. Pseudarthrosis of the Calcaneus: Advantages of regenerative Medicine in the Managment of a Rare Entity, A Case Report and Review of Literature. **The Open Orthopaedics Journal**, v. 12, n. 1, p. 141-146, 2018.

WAJNSZTEJN, A. et al. Fixação das fraturas do platô tibial com placas pela via de acesso posterior-relato preliminar de 12 casos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 46, n. 1, p. 18-22, 2011.

WALKER, M.; SHARAREH, B.; MITCHEL, S. A. Masquelet Reconstruction for Posttraumatic Segmental Bone Defects in the Forearm. **The Journal of Hand Surgery**, v.44, n. 4, p. 342.e1-342.e8, 2019.

WECHMANN, M. et al. The effect of smoking on posttraumatic pseudoarthrosis healing after internal stabilization, treated with platelet rich plasma (PRP). **Open Medicine**, v. 13, n. 1, p. 425-432, 2018.

ZUK P.A, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**. v. 7, n. 2, p.211-228, 2001.

ANEXOS

8. ANEXO A – TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo: Estudo randomizado da enxertia autóloga de células da medula óssea enriquecidas ou não com plasma rico em plaquetas, para consolidação da pseudoartrose e leão ligamentar do joelho em relação aos tratamentos convencionais.

Pesquisador Responsável: Prof Dr. Gildásio de Cerqueira Daltro

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o participante da pesquisa não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo participante da pesquisa.

Objetivo do Estudo

O objetivo do estudo é: Comparar a eficácia da utilização de células tronco da medula óssea (Componente do osso que fabrica células novas) com a adição ou não com de um concentrado de plaquetas (Componente do sague que atua na coagulação do sangue), associadas ou não com biomaterial para consolidação da pseudoartrose (falta de consolidação do osso após fratura).

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de 2 anos

A sua participação no estudo será de aproximadamente 2 anos

Descrição do Estudo

Participação do estudo aproximadamente 220 indivíduos.

Este estudo será realizado no serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos

O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque é maior de 18 anos, apresenta uma fratura que não curou no período de 3 meses (pseudoartrose não infectada, com espaço entre os fragmentos de até 10mm nas radiografias em duas incidências, tratados ou não com alguma forma de estabilização ou fixação), ou apresenta evidência clínica e imagem de Ressonância Nuclear Magnética de lesão ligamentar

O (a) Senhor (a) não poderá participar do estudo se houver ferida aberta, sem cobertura da pele, no foco da fratura, presença de lesões ligamentares múltiplas, deformidade angular

ou encurtamento pré-existente que necessite de tratamento, infecção no local ou outras comorbidades que contra indiquem procedimento cirúrgico, se fizer uso crônico de corticoide e imunossuppressores, ou fizer abuso ou dependência alcoólica pelos critérios do DSM V (manual de doenças psiquiátricas).

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar, serão realizados coleta e injeção de células em centro cirúrgico sob anestesia. O senhor (a) será posicionado igualmente às cirurgias convencionais. O material retirado da medula óssea será realizado da crista ilíaca posterior (parte do osso da bacia) sob raqui anestesia (anestesia na coluna) e sedação leve (que irá provocar por meio de agulha. Essa agulha será introduzida cerca de 6 cm de profundidade em direção ao osso esponjoso da crista ilíaca de modo que sua ponta se situe entre as mesas interna e externa. Serão aspirados cerca de 100ml de medula óssea ("tutano do osso"), através de seringas de plástico de 10ml contendo anticoagulante, que serão preenchidas com volume máximo de 5ml cada, para reduzir o grau de diluição pelo sangue periférico. Três a cinco perfurações serão feitas na crista ilíaca, através da mesma abertura na pele com perfurações espaçadas cerca de 2cm. Um sistema automatizado e fechado será utilizado para a separação e a concentração da fração de células mononucleares (Células tronco que serão utilizadas para o tratamento) do aspirado de medula óssea. As células serão re-processadas com uma proteína (albumina a 5%) e podem ou não ser enriquecidas com o Plasma Rico em Plaquetas, componente que aumenta o potencial de regeneração óssea. Este procedimento será realizado conforme o processo de randomização dos participantes da pesquisa, que não saberão em que grupo foram colocados, bem como não serão previamente conhecidos pelo cirurgião. A preparação do plasma rico em plaquetas acontecerá 2 horas antes da cirurgia de enxertia. Dez ml de sangue periférico serão coletados e passará por duas centrifugações para obtermos o material desejado. A enxertia das células mononucleares da medula óssea será feita com a mesma agulha utilizada para aspiração, que será guiada por radiografia, e no momento da injeção a pele será perfurada na região da pseudoartrose. Vinte mL da solução contendo células mononucleares da medula óssea serão injetados lentamente através da agulha após, a perfuração da pele será fechada com uma sutura circunferencial (dar pontos na pele) para evitar vazamento da solução contendo as células injetadas. O reparo de lesão ligamentar será realizado por via artroscópica (uma câmera dentro do joelho), assim como a injeção de células. Durante o pós-operatório o participante da pesquisa será mantido sob fixação primária e não será permitida a sustentação de peso durante os primeiros 30 dias após o procedimento. No final do primeiro mês, caso não haja dor e seja observada ponte cortical ou desaparecimento das linhas de fratura em pelo menos três dos quatro cortes vistos em radiografias o gesso ou fixação externa será retirada.

Existem alternativas o tratamento para a pseudoartrose, e estão definidos na literatura médica fixações do foco da fratura através de placas, parafusos, e o fixador externo o mais utilizado atualmente. Os participantes da pesquisa que durante o período entre a seleção e a cirurgia evoluírem com quadro de infecção, poderão ser incluídos no grupo controle e serão submetidos ao tratamento padrão. Cabe ressaltar que o tratamento padrão, preconizado pela sociedade Brasileira de Ortopedia, consiste no uso de enxerto ósseo no foco da pseudoartrose.

Os resultados dos exames serão fornecidos nas consultas de seguimento que ocorrerão em 1, 3 e 6 meses após o procedimento cirúrgico e serão feitas radiografias simples para avaliar a progressão e aparecimento de calo ósseo. Tomografia computadorizada será realizada em 6 meses para verificar o volume do calo mineralizado formado.

Hoje o tratamento convencional padrão utilizado para a pseudoartrose é a cirurgia ortopédica para fixação da fratura com placas, parafusos e tutor intramedular. Para o tratamento das lesões ligamentares do joelho, a cirurgia padrão hoje, é a cirurgia para

substituição do ligamento lesionado por um enxerto autólogo (usar um tendão de um músculo para substituir o ligamento com defeito)

A amostra da sua medula óssea passará por análise de laboratório da universidade para a contagem das células que estão contidas nela. Após esta análise e utilização da amostra para seu tratamento, caso haja alguma sobra da amostra, esta será descartada e não será utilizada para outro meio ou pesquisa

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

Apesar das múltiplas publicações de séries de casos empregando tratamento semelhante ao que esta sendo proposto neste projeto, os riscos em longo prazo são desconhecidos. O(A) senhor (a) pode experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados.

Riscos associados com a cirurgia: Infecção da ferida cirúrgica, Dor, Formação de cicatriz excessiva em torno da ferida. Riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados com a correta utilização das técnicas de assepsia e antisepsia e a correta técnica de coleta de sangue e cirúrgicas serão tomadas para minimizar esses riscos.

Benefícios para o participante da pesquisa

Não há benefício direto para o participante da pesquisa desse estudo. Trata-se de estudo de protocolo clínico testando a hipótese de que a enxertia autóloga de células da medula óssea enriquecidas ou não com plasma rico em plaquetas, para consolidação da pseudoartrose e leão ligamentar do joelho apresenta melhores resultados em relação aos tratamentos convencionais.

Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a garantir melhores modalidades de tratamento para lesões crônicas que até então não possuem evolução favorável.

Compensação

O(A) senhor(a) não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional, todas as eventuais despesas geradas pela pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador principal.

Será garantido o direito a assistência integral e gratuita, devido a danos decorrentes da participação na pesquisa e pelo tempo que for necessário ao participante da pesquisa

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, o(a) senhor(a) somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, o(a) senhor(a) terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar

de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição. O(A) senhor(a) receberá uma via deste termo de consentimento assinada e rubricada, na sua presença, pelo pesquisador principal do estudo e por o(A) senhor(a).

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a O(A) senhor(a) por escrito. Se O(A) senhor(a) decidir continuar neste estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante da pesquisa tem direito a tratamento médico de forma integral, gratuita e pelo período que for necessário, na Instituição bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do participante da pesquisa a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo O(A) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O responsável pelo estudo nesta instituição é Prof Dr. Gildasio de Cerqueira Daltro, que poderá ser encontrado no Serviço de Ortopedia e Traumatologia Enfermaria 2D do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (local este de atenção 24h) ou nos respectivos telefones: 3283-8136/71-98696-1222

Endereço e contato do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Endereço: Rua Augusto Viana, s/no - 1o Andar Bairro: Canela CEP: 40.110-060 UF: BA Município: SALVADOR Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com. Horário de atendimento: Segunda a sexta - 8:00h às 12:30h e 13:30 às 17:30h

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é formado por grupo com diversos profissionais, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos sujeitos de pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos. CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Declaração de Consentimento

Concordo em participar do estudo intitulado "Estudo randomizado da enxertia autóloga de células da medula óssea enriquecidas ou não com plasma rico em plaquetas, para consolidação da pseudoartrose e leão ligamentar do joelho em relação aos tratamentos convencionais."

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização dos meus registros médicos (prontuários médico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição.

Nome do Participante da pesquisa - Letra de Forma ou à Máquina	Data
--	------

Assinatura do Participante da pesquisa

Nome do Representante Legal do Participante da pesquisa - Letra de Forma ou à Máquina (quando aplicável)	Data
--	------

Assinatura do Representante Legal do Participante da pesquisa (quando aplicável)

Nome da pessoa obtendo o Consentimento	Data
--	------

Assinatura da Pessoa Obtendo o Consentimento

Nome do Pesquisador Principal

Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal

Data
