

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS, MEDULA ÓSSEA OU
QUITOSANA NAS OSTEOSÍNTESES MINIMAMENTE
INVASIVAS NA TÍBIA DE CÃES**

**Fabricia Geovânia Fernandes Filgueira
Médica Veterinária**

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS, MEDULA ÓSSEA OU
QUITOSANA NAS OSTEOSSÍNTESES MINIMAMENTE
INVASIVAS NA TÍBIA DE CÃES**

Fabília Geovânia Fernandes Filgueira

Orientador: Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para
obtenção do título de Doutora em
Cirurgia Veterinária (Área de
Concentração em Cirurgia
Veterinária).**

2015

Filgueira, Fabrícia Geovânia Fernandes

F483p Plasma rico em plaquetas, medula óssea ou quitosana nas
osteossínteses minimamente invasivas na tíbia de cães / Fabrícia Geovânia
Fernandes Filgueira. – – Jaboticabal, 2015

xxiii, 103 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Bruno Watanabe Minto

Banca examinadora: Paola Castro Moraes, Sheila Canevese Rahal,
Cláudia Valéria Seullner Brandão, Olécies da Cunha

Bibliografia

1. Biomateriais. 2. Canino. 3. Consolidação óssea. 4. Ortopedia. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.718.5:636.7

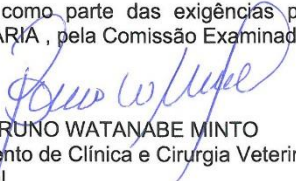
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

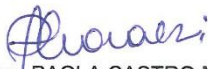
TÍTULO: PLASMA RICO EM PLAQUETAS, MEDULA ÓSSEA OU QUITOSANA NAS
OSTEOSSÍNTESES MINIMAMENTE INVASIVAS NA TÍBIA DE CÃES

AUTORA: FABRÍCIA GEOVÂNIA FERNANDES FILGUEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIRURGIA
VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal


Profa. Dra. SHEILA CANEVESE RAHAL
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia de Botucatu


Profa. Dra. CLÁUDIA VALÉRIA SEULLNER BRANDÃO
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia de Botucatu


Prof. Dr. OLÍVIA DA CUNHA
Universidade Federal do Paraná / Palotina/PR

Data da realização: 17 de junho de 2015.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FABRÍCIA GEOVÂNIA FERNANDES FILGUEIRA – nascida em Mossoró, Rio Grande do Norte, aos 26 de agosto de 1986, filha de Jeová Filgueira Leão e Francisca Fernandes Filgueira. Em dezembro de 2008, graduou-se em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA, Câmpus de Mossoró, Rio Grande do Norte, no qual o tema escolhido para o seu Trabalho de Conclusão de Curso foi “Ruptura de uretra em cão”. Em 2009, foi aprovada para cursar o Programa de Aperfeiçoamento (Residência) em Medicina Veterinária na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais no Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Câmpus de Patos, Paraíba, sob orientação do Prof. Dr. Pedro Isidro da Nóbrega Neto, tendo como título do seu trabalho de conclusão de residência “Fratura de patela e ruptura do tendão patelar em cão”. Obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária, na área de Clínica e Cirurgia de Animais de Companhia em fevereiro de 2012, pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária na mesma Instituição sob a mesma orientação. Atualmente é doutoranda do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo.

EPÍGRAFE

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria”.

(1 Coríntios 13, 1-2)

DEDICATÓRIA

À Deus Pai que sempre me deu forças, fé e coragem para continuar nessa jornada. Com ele, tudo foi possível até mesmo quando eu não acreditei.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus que me deu força, vida e fé. Que me sustentou e me levantou nos momentos difíceis. Que abriu portas e oportunidades quando outras se fecharam. Que me deu uma família e amigos maravilhosos com quem sempre pude contar. Obrigada!

À minha mãe, Francisca Fernandes Filgueira, e meu pai, Jeová Filgueira Leão, que me deram educação e me ajudaram a me tornar o que sou hoje. Amo vocês!

À minha avó, Maria Fernandes de Souza, com suas palavras de fé e religiosidade que sempre me fizeram acreditar que tudo era possível.

Aos meus irmãos, Patrícia Filgueira e Leandro Filgueira, e meu cunhado Jaermerson Sena que me incentivaram e me ajudaram em tudo. Sem o amor deles eu não estaria aqui.

Ao professor Bruno Minto, por ter confiado em mim quando nem me conhecia direito e por todo apoio, ensinamentos e conselhos que compartilhou. Muito obrigada!

Às minhas amigas da “turma das 7 mulheres” (Carla Monadeli, Gabriela Lima, Geyanna Nunes, Isabella Barros, Leíse Fernandes, Maíra Lima) que mesmo estando longe, me deram forças, apoio emocional e tiraram muitas dúvidas.

Às minhas amigas e irmãs da Misto Quente: Aline Kawanami e Denise Chung. Não tenho nem palavras para dizer o quanto sou grata, pois foram quem mais me deram apoio emocional nesses anos que fiquei em Jaboticabal. Obrigada por terem me ajudado no projeto! Obrigada pela companhia nos fins de semana. Obrigada pelas risadas! Obrigada por existirem!

Às minhas amigas da república Aeee: Cristiane Fernandes, Isa Braga, Mariana Rondelli, Tathiana Motheo e Paula Penacchi. Obrigada pelo apoio e pela amizade. Obrigada pelos conselhos!

Aos meus amigos e amigas Aline Macedo, Nathan Cruz, Vivian Tavares, Andréa Bastos, Roberta Renzo e Joseane Queiroz pelas risadas e companheirismo no dia-a-

dia. Obrigada pelas corridas no fim de tarde, pelos almoços do fim de semana, companhia nas festas.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de ortopedia: Arícia Sprada, João Souza, Fernando, Tiago Prada, Lívia Coelho, Luís Guilherme Faria, Guilherme Galhardo, Paula Gomide e Leonardo Leal.

Há quem achar que os amigos são meros figurantes em nossas vidas. Quem pensa assim, mal sabe ou se quer teve a oportunidade de desfrutar da beleza de uma amizade, pois mesmos alguns amigos que embora não tenham ajudado no projeto de doutorado, muitas vezes podem ser mais importantes do que quem o fez. Uma mente sã é uma das coisas que mais influencia e nos torna capazes de acreditarmos em nós mesmos, sendo fundamental para realização de qualquer atividade que vá interferir na carreira profissional de alguém. Felizes daqueles que tem amigos!

Aos meus amigos da Igreja santa Teresa de Jesus, que foram importantes para o meu crescimento espiritual.

Ao meu namorado Bruno Fernandes e sua família que me acolheram com muito amor em suas vidas.

Aos meus professores e exemplos de pessoa: Professora Paola Castro Moraes e Professor Luís Gustavo Gosuen Dias. Obrigado pelos ensinamentos e por me ajudarem quando precisei.

Aos professores João Ademir e André Escobar pela ajuda com estatística. Podem ter certeza que aprendi muito!

Aos funcionários do Hospital Veterinário que me ajudaram no desenvolvimento do projeto.

À Fundação de amparo a pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado (Processo FAPESP 2012/16712-7) e pelo auxílio à pesquisa (Processo FAPESP 2012/20642-4). Sem seu apoio seria difícil ter realizado essa pesquisa!

A todos os animais e proprietários que participaram dessa pesquisa. Sem a colaboração deles, esse trabalho não seria possível.

Apresentação

O presente trabalho foi dividido em capítulos para melhor compreensão, no qual o capítulo 1 (um) corresponde a uma breve introdução do tema pesquisado; o capítulo 2 (dois) é o artigo que representa o principal resultado da tese; o 3 (três) é uma revisão a respeito das aplicações percutâneas na ortopedia veterinária e; o capítulo 4 (quatro) inclui as limitações e conclusões da pesquisa. Anexo aos apêndices encontra-se a metodologia detalhada de como foi realizado o trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	vi
LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
 CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	 1
1 Introdução.....	1
2 Justificativa.....	3
3 Hipótese.....	4
4 Objetivos.....	4
4.1 Gerais.....	4
4.2 Específicos	4
5 Referências.....	5
 CAPÍTULO 2 - Plasma rico em plaquetas, medula óssea ou quitosana nas osteossínteses minimamente invasivas da tíbia de cães.....	 9
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Introdução.....	10
Material e métodos.....	12
Delineamento experimental.....	12
Preparo dos biomateriais.....	13
Preparação do concentrado de medula óssea.....	13
Preparação do plasma rico em plaquetas.....	13
Preparação do gel de quitosana.....	14
Procedimento cirúrgico.....	14
Cuidados pós-operatórios.....	15

Avaliações pós-operatórias.....	16
Análise estatística.....	17
Resultados.....	17
Discussão.....	22
Conclusões.....	26
Agradecimentos.....	27
Referências.....	27
 CAPÍTULO 3 – Aplicações percutâneas na ortopedia veterinária.....	 32
Resumo.....	32
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Enxertos e biomateriais.....	34
Terapia celular.....	38
Aplicações clínicas.....	39
Conclusões.....	42
Agradecimentos.....	42
Referências.....	42
 CAPÍTULO 4 – Considerações finais.....	 48
Limitações do estudo.....	48
Conclusões.....	48
 APÊNDICES.....	 49
Apêndice A (Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais).....	50
Apêndice B (Resumo da metodologia).....	51
Apêndice C (Termo de consentimento livre e esclarecido).....	68
Apêndice D (Ficha de acompanhamento clínico-cirúrgico dos animais).....	70
Apêndice E (Tabela que relaciona os trinta pacientes inclusos nos grupos experimentais).....	73
Apêndice F (Resultado do preparo dos biomateriais).....	76

Apêndice G (Implantes utilizados nos animais dos grupos experimentais).....	78
Apêndice H (Avaliação clínica quanto à intensidade do edema no membro após a cirurgia e a capacidade de deambulação dos pacientes).....	80
Apêndice I (Os resultados estatísticos das variáveis radiográficas).....	82
Apêndice J (Resultados da avaliação por densitometria óptica).....	89
ANEXOS.....	91
Anexo 1.....	92
Anexo 2.....	98
Anexo 3.....	103

PLASMA RICO EM PLAQUETAS, MEDULA ÓSSEA E QUITOSANA NAS OSTEOSÍNTESES MINIMAMENTE INVASIVAS NA TÍBIA DE CÃES

RESUMO - A osteossíntese minimamente invasiva com placa (MIPO) tem sido cada vez mais aceita para o tratamento de fraturas em pequenos animais, especialmente pela capacidade de preservação do hematoma inicial do foco fraturado. Outra forma de auxiliar o processo cicatricial ósseo é a utilização de biomateriais, tais como o plasma rico em plaquetas (PRP), aspirado de medula óssea (MO) e a quitosana (QUI). Objetivou-se, na presente pesquisa, avaliar a consolidação óssea obtida da MIPO e injeção percutânea de PRP, MO e QUI, no foco de fraturas tibiais de cães, por meio de exames clínicos, radiográficos e de densitometria óptica. Foram utilizados trinta cães apresentando fraturas da tíbia e atendidos na rotina cirúrgica do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Jaboticabal. Os grupos foram formados de acordo com o biomaterial injetado sendo: grupo 1 (nada foi injetado), grupo 2 (MO), grupo 3 (PRP) e grupo 4 (QUI). Foram injetados 2 mL de cada biomaterial no foco da fratura, imediatamente após o procedimento de osteossíntese minimamente invasiva com placa bloqueada. Os animais foram avaliados quanto a intensidade de formação do edema (EDE), atividade deambulatoria (DEAM), exames radiográficos e densitometria óptica no momento imediato após a cirurgia e 15, 30, 60, 90 e 120 dias pós-operatórios. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação ao EDE e DEAM. Setenta por cento dos animais operados nos diversos grupos apresentaram apoio do membro grau 4 ou 5 aos 15 dias de pós-operatório. Aos 30 dias, todos os animais apresentavam deambulação grau 5. Dentre os grupos (1, 2, 3 e 4) não se observou diferença estatística quanto ao uso do membro, entretanto o grupo 2 foi o que apresentou maior porcentagem (60%) de apoio aos 15 dias (grau 5). Houve diferença quanto ao momento da consolidação, ocorrendo mais cedo no grupo 2 (46,87 dias). Não houve diferença estatística na densidade mineral do calo ósseo formado entre os grupos e os momentos avaliados. Os biomateriais PRP, MO e QUI associados a MIPO auxiliaram contribuindo na consolidação óssea na tíbia de cães. O concentrado de MO promove a consolidação óssea mais precoce.

Palavras-chave: aplicação percutânea, biomateriais, cão, consolidação óssea

PLATELET-RICH PLASMA, BONE MARROW OR CHITOSAN IN MINIMALLY INVASIVE OSTEOSYNTHESIS IN THE TIBIA IN DOGS

ABSTRACT - Minimally invasive plate osteosynthesis (MIPO) has become widely accepted for the treatment of fractures in small animals, especially because of the preservation of the initial hematoma and minimization of the soft tissues damage. Another way to improve bone healing is the use of biomaterials, such as platelet-rich plasma (PRP), aspirated bone marrow (MO) and chitosan (QUI). The aim of this study was to evaluate the bone healing after the association of MIPO and percutaneous injection of PRP, MO, and QUI in the treatment of tibial fractures in dogs. Clinical and radiographic examination and optical densitometry were used. Thirty dogs from the surgical routine of the Veterinary Teaching Hospital of the Faculty of Agricultural and Veterinarian Sciences (UNESP, Jaboticabal) presenting tibial fractures were used. The groups were formed according to injected biomaterial: group 1 (nothing was injected), group 2 (MO), group 3 (PRP) and group 4 (QUI). Two milliliters of each biomaterial was injected into the fracture site percutaneously just after the surgery. The dogs were evaluated for the intensity of edema formation (EDE), ambulatory activity (DEAM), radiographs and optical densitometry, immediately after surgery and 15, 30, 60, 90 and 120 days postoperatively. There was no significant difference between groups considering EDE and DEAM. Seventy percent of the animals presented member support grade 4 or 5 at 15 days postoperatively. After 30 days, all dogs presented without lameness. Among the groups, there was no statistical difference in the walk, however the group 2 showed the highest percentage (60%) of weight bearing at 15 days. There was a difference considering clinical union in the group 2 (46,87 days). There was no statistical difference in the mineral density of the bone callus formed between the groups and the moments assessed. The PRP, MO and QUI associated with MIPO help bone regeneration in the treatment of tibial fractures in dogs. Bone marrow concentrated promotes shorter bone healing time.

Keywords: biomaterials, bone healing, dog, percutaneous application

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

AO - “Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen”

ASIF - “Association for the Study of Internal Fixation”

CBCAV – Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CRIF- Clamp-rod internal fixator

CT – Célula Tronco

DCP - Placa de compressão dinâmica “Dynamic Compression Plate”

DEAM - Grau de deambulação

DO – Densitometria óptica

Dra. - Doutora

EAR - Escala de avaliação radiográfica

EDE - Grau de intensidade do edema

FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

GEPA – Grupo de estudos de pequenos animais

Grupo 1 – Grupo controle

Grupo 2 – Grupo em que se aplicou medula óssea no foco da fratura

Grupo 3 – Grupo em que se aplicou plasma rico em plaquetas no foco da fratura

Grupo 4 – Grupo em que se aplicou quitosana no foco da fratura

h - hora

IL-1- interleucina um

IM - Índice de mineralização

IMCC - Índice de mineralização na projeção craniocaudal

IMML - Índice de mineralização na projeção mediolateral

IV - Por uso intravenoso

kg – Quilogramas

log - Logaritmo

LCO - Localização do calo ósseo periosteal

LCDPC - Placa de compressão dinâmica de baixo contato ou “Limited Contact Dynamic Compression Plate”

LCP - Placa bloqueada ou “Locking Compression Plate”

mg/kg – Miligramas por quilograma de peso vivo

MIO - Osteossíntese minimamente invasiva ou “Minimally Invasive Osteosynthesis”

mL - Mililitros

mm – Milímetros

μL - Microlitros

MO – Medula óssea

MOC – Medula óssea centrifugada

M0 - Pós-Operatório imediato

M15 - 15 dias de pós-operatório

M30 - 30 dias de pós-operatório

M60 - 60 dias de pós-operatório

M90 - 90 dias de pós-operatório

M120 - 120 dias de pós-operatório

MIPO - Osteossíntese Minimamente Invasiva com Placa ou “Minimally Invasive Plate Osteosynthesis”

MPA - Medicação pré-anestésica

OBDNT - Abra, mas não toque ou “Open, but do not touch”

ORIF - Redução aberta da fratura e fixação interna ou “Open reduction and internal fixation”

PAF-4 - Fator ativador de plaquetas quatro

PDEGF - Fator de crescimento celular endotelial derivado das plaquetas

PMN - Leucócitos polimorfonucleares

PPO - Presença de ponte óssea

Profa. - Professora

PRP – Plasma rico em plaquetas

QUI - Quitosana

RC - Restabelecimento das corticais

RCM - Restabelecimento do canal medular

RCO – Remodelamento do calo ósseo

RLF – Radiopacidade da linha de fratura

RPM – Rotações por minuto

SP – São Paulo

SRD – Sem raça definida

TGF/ β 1 e β 2 - Fator de crescimento transformador β

UNESP – Universidade Estadual Paulista

USA – Estados Unidos da América “United States of America”

VCO – Volume do calo ósseo

VCP - Placas veterinárias cortáveis “Veterinary Cuttable Plate”

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Classificação em escores do grau de intensidade de edema (EDE) da ferida cirúrgica observado para avaliação pré e pós-operatória de cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e gel de quitosana nas fraturas da tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....61
- Quadro 2. Classificação em escores do grau de deambulação (DEAM) clínica de acordo com características observadas para avaliação pré e pós-operatória de cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e gel de quitosana nas fraturas da tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....61
- Quadro 3. Classificação em escores das características da avaliação radiográfica observadas nas radiografias nos momentos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e gel de quitosana nas fraturas de tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP – 2015.....62
- Quadro 4. Escala de avaliação radiográfica (EAR) de acordo com características da linha de fratura observadas nas radiografias em avaliação nos momentos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e gel de quitosana nas fraturas de tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....63

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2	
Figura 1.	Imagens fotográficas das radiografias no período experimental. 1. Paciente de número 3 do grupo 1 (controle) na projeção craniocaudal. 1A: Fratura cominutiva em terço médio da tíbia (seta) em projeção mediolateral; 1B: Projeção craniocaudal indicando a fratura cominutiva (seta); 1C: Pós-operatório imediato com bom alinhamento do eixo ósseo; 1D: 15 dias de pós-operatório com início de formação do calo ósseo; 1E: 30 dias de pós-operatório com união clínica da fratura; 1F: 60 dias de pós-operatório; 1G: 90 dias de pós-operatório; 1H: 120 dias de pós-operatório com remodelamento ósseo. 2. Paciente de número 8 do grupo 2 (medula óssea) na projeção craniocaudal. 2A: Fratura oblíqua longa em terço médio da tíbia (seta) em projeção mediolateral; 2B: Projeção craniocaudal indicando a fratura oblíqua longa (seta); 2C: Pós-operatório imediato com bom alinhamento do eixo ósseo; 2D: 15 dias de pós-operatório com início de formação do calo ósseo; 2E: 30 dias de pós-operatório com união clínica da fratura; 2F: 60 dias de pós-operatório; 2G: 90 dias de pós-operatório; 2H: 120 dias de pós-operatório. 3. Paciente de número 8 do grupo 3 (plasma rico em plaquetas) na projeção craniocaudal. 3A: Fratura cominutiva em terço médio da tíbia (seta) em projeção mediolateral; 3B: Projeção craniocaudal indicando a fratura cominutiva (seta); 3C: Pós-operatório imediato com bom alinhamento do eixo ósseo; 3D: 15 dias de pós-operatório com início de formação do calo ósseo; 3E: 30 dias de pós-operatório com união clínica da fratura; 3F: 60 dias de pós-operatório; 3G: 90 dias de pós-operatório; 3H: 120 dias de pós-operatório com remodelamento ósseo. 4. Paciente de número 5 do grupo 4 (quitosana) em projeção craniocaudal. 4A: Fratura oblíqua longa em terço médio da tíbia (seta) em projeção mediolateral; 4B: Projeção craniocaudal indicando a fratura oblíqua longa (seta); 4C: pós-operatório imediato com bom alinhamento do eixo ósseo; 4D: 15 dias de pós-operatório; 4E: 30 dias de

pós-operatório; 4F: 60 dias de pós-operatório; 4G: 90 dias de pós-operatório com união clínica da fratura; 4H: 120 dias de pós-operatório com remodelamento ósseo.....20

Apêndice B

- Figura 1. A. Imagem fotográfica de um tubo do tipo falcon contendo o hidrogel de quitosana (seta). B. Hidrogel de quitosana (seta) sendo aplicado no foco da fratura após o procedimento de osteossíntese minimamente invasiva com placa em um animal do grupo 4 (quitosana), Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP. Jaboticabal, SP – 2015.....56
- Figura 2. A. Imagem fotográfica da sequência da osteossíntese minimamente invasiva com placa na tíbia. Incisões proximais e distais (setas amarelas) ao foco da fratura. B. Verificação do tamanho da placa a ser utilizada no membro. C. Introdução da placa pelo túnel de tecidos moles adjacentes à superfície do osso, sobre o local da fratura. D. Inserção dos parafusos na placa óssea. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP. Jaboticabal, SP – 2015.....58
- Figura 3. A. Imagem fotográfica da injeção percutânea de 2 mL de concentrado de medula óssea (seta amarela) no foco da fratura (círculo amarelo) após osteossíntese minimamente invasiva com placa na tíbia de um cão do grupo 2 (medula óssea). B. Após injeção percutânea de 2 mL de gel de quitosana (seta amarela) no foco da fratura (círculo amarelo). Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP. Jaboticabal, SP - 2015.....59
- Figura 4. Gráfico de determinação do Índice de Mineralização para avaliação da radiopacidade do calo ósseo formado nas radiografias de cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e gel de quitosana nas fraturas de tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....65

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2		
Tabela 1.	Médias e desvio padrão da variável RCM (restabelecimento do canal medular) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva.....	19
Tabela 2.	Média dos momentos (M15, M30, M60, M90 e M120) de consolidação óssea de acordo com a escala de avaliação radiográfica (EAR) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva.....	19
Apêndice		
Tabela 1E.	Idade, peso, raça, sexo e classificação das fraturas (AO/ASIF - PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009).), dos cães incluídos nos grupos experimentais (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e submetidos à osteossíntese minimamente invasiva com placa, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP – 2015.	73
Tabela 1F.	Contagem das células nucleadas dos animais do grupo 2 – medula óssea, antes, após a centrifugação e quanto concentrou das células nucleadas em porcentagem, submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP – 2015.....	76
Tabela 2F.	Contagem das plaquetas dos animais do grupo 3 – plasma rico em plaquetas, antes, após do protocolo de confecção e quanto vezes	

concentrou em relação a contagem inicial, submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....77

Tabela 1G. Descrição da espessura da placa bloqueada (mm), número de furos e quantidades de furos preenchidos com parafusos nos fragmentos proximal e distal. Esses implantes foram utilizados nos animais submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e quitosana nas fraturas de tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....78

Tabela 1H. Médias e desvio padrão da intensidade da formação do edema comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....80

Tabela 2H. Médias e desvio da avaliação deambulatoria comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....81

Tabela 1I. Médias e desvio padrão da variável RLF (radiopacidade da linha de fratura) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em

	cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP – 2015.....	82
Tabela 2I.	Médias e desvio padrão da variável LCO (localização do calo ósseo periosteal) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....	83
Tabela 3I.	Médias e desvio padrão da variável PPO (presença de ponte óssea) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....	84
Tabela 4I.	Médias e desvio padrão da variável RC (restabelecimento das corticais) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....	85
Tabela 5I.	Médias e desvio padrão da variável RCO (remodelamento do calo ósseo) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em	

	cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....	86
Tabela 6I.	Médias e desvio padrão da variável VCO (volume do calo ósseo) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....	87
Tabela 7I.	Médias e desvio padrão da variável EAR (escala de avaliação radiográfica) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP – 2015.....	88
Tabela 1J.	Médias e desvio padrão dos valores obtidos para o índice de mineralização nas radiografias em projeção craniocaudal (IMCC) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP – 2015.....	79
Tabela 2J.	Médias e desvio padrão dos valores obtidos para o índice de mineralização nas radiografias em projeção mediolateral (IMML) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico	

em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.....90

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. Introdução

Primordialmente, a técnica de redução de uma fratura deve objetivar o reposicionamento anatômico dos fragmentos ósseos e a restauração do alinhamento e função normal do membro (OLIVEIRA, 2009). Classicamente, o manejo terapêutico das fraturas dos ossos longos em cães e gatos envolve a redução direta e estabilização aberta dos fragmentos. No entanto, este método convencional requer uma abordagem cirúrgica extensa e experiência para minimizar as complicações potenciais, tais como a lesão aos tecidos moles e ao suprimento sanguíneo ósseo (KOCH, 2005).

Assim, abordagens mais cautelosas tais como a “abra, mas não toque” (“Open, But Do Not Touch” – OBDNT) foram encorajadas. Entretanto, ainda buscava-se um menor grau de manipulação dos tecidos, para maximizar a preservação do hematoma primordial da fratura e reduzir a lesão iatrogênica das estruturas adjacentes ao foco fraturado. Uma opção encontrada, para casos selecionados, foi a abordagem conhecida como osteossíntese minimamente invasiva (Minimally Invasive Osteosynthesis –MIO), que obedece aos princípios de uma fixação interna biológica (PERREN, 2002).

A fixação interna biológica é um tipo de osteossíntese que prioriza a manutenção do ambiente da fratura, tentando minimizar danos ao suprimento sanguíneo e evitando manipulação excessiva dos fragmentos ósseos; como consequência, as fraturas podem ter a precisão de redução anatômica reduzida, assim como a qualidade da estabilidade (PERREN, 2003). Nestes casos, a fratura não é exposta e os fragmentos são reduzidos indiretamente (KRETTEK; MULLER; MICLAU, 2001).

A estabilização cirúrgica utilizando a MIO pode ser alcançada com variados tipos de implantes como fixadores externos, hastes bloqueadas, placas e parafusos, entre outras associações como o *plate and rod* (placa e pino intramedular) (DÉJARDIN; GUIOT; VON PFEIL, 2012). Apesar das diversas possibilidades, as

placas e parafusos representam o sistema mais comumente utilizado. Neste caso, ele é chamado de osteossíntese minimamente invasiva com placa (Minimally Invasive Plate Osteosynthesis - MIPO) (GUIOT; DÉJARDIN, 2011).

O implante utilizado na osteossíntese biológica deve ser estável e relativamente flexível, para permitir consolidação óssea secundária, ou seja, consolidação indireta com formação de calo ósseo. As vantagens biológicas destas técnicas podem, potencialmente, acelerar a união óssea clínica, permitindo retorno a função locomotora mais rápida a despeito de certo grau de instabilidade na fratura (PERREN, 2003).

A MIPO é indicada principalmente para fraturas diafisárias não passíveis de reconstrução anatômica com trauma extenso aos tecidos moles, ou seja, quando não se consegue reconstruir a coluna óssea (HUDSON; POZZI; LEWIS, 2009). Entretanto, Beale e Mccally (2012) citam que não há contraindicações para realizar a MIPO, desde que se tenha um intensificador de imagem transoperatório, podendo ser indicadas até mesmo nas fraturas articulares, as quais há a necessidade de redução anatômica.

A complicação mais comum quando da utilização da MIPO é o mau alinhamento do membro (HULSE, 2012). Esse erro pode ser evitado com a utilização de intensificadores de imagem como o fluoroscópio (BEALE; MCCALLY, 2012). Outras complicações importantes incluem lesão ao suprimento sanguíneo e nervoso devido a tração excessiva do membro, infecção, inserção de parafuso na articulação e falhas do implante (PEIRONE et al., 2012).

Os biomateriais são substâncias desenvolvidas com o propósito de tratar, aumentar ou substituir de forma parcial ou total diversas partes do organismo, sendo formados por um ou mais materiais (PERRI DE CARVALHO et al., 2002; GIL; FERREIRA, 2006). No caso das fraturas ósseas, eles possuem a função de estimular uma consolidação precoce ou ainda minimizar danos ou atrasos na consolidação que poderiam ocorrer devido a traumas excessivos de manipulação durante o procedimento cirúrgico.

Recentemente, as pesquisas utilizando medula óssea (VAZ et al., 2010), plasma rico em plaquetas (LINS; HARTMANN; ROSENFELD, 2014) e quitosana (GUZMÁN et al., 2014) como biomateriais osteoestimuladores, têm aumentado. Considerando-se as potenciais complicações associadas com a cirurgia ortopédica,

muitas vezes de difícil resolução ou mesmo desastrosas, têm se buscado incessantemente formas de facilitar ou potencializar o processo de consolidação óssea. Neste sentido, o emprego de biomateriais aplicados percutaneamente no reparo de partes danificadas do tecido ósseo tem sido alvo de diversas pesquisas na ortopedia veterinária. Além disso, no conhecimento dos autores não há pesquisas utilizando a osteossíntese minimamente invasiva com placa associada a aplicação percutânea de biomateriais.

2. Justificativa

Procedimentos minimamente invasivos, com trauma cirúrgico limitado aos tecidos moles e osso, já têm sido aplicados no manejo de fraturas por um longo período na Medicina (BABST; KHONG, 2007). Os primeiros resultados clínicos demonstraram vantagens importantes destas abordagens, que melhoram a consolidação da fratura e reduzem o risco de infecção (KREGOR et al., 2004). Desta forma, o uso de placas percutâneas em osteossíntese minimamente invasiva (MIPO) é recomendado na reparação de fraturas no ser humano (COLLINGE; SANDERS, 2000; AITA et al., 2014). Na Medicina Veterinária, são crescentes os estudos utilizando essa técnica (SCHMOKEL et al., 2007; GUIOT; DÉJARDIN, 2011; BARONCELLI et al., 2012; FLÔRES, 2013; BALLABEN, 2014).

Além disso, existe uma crescente busca por biomateriais que possam agir como substitutos ósseos ou como coadjuvantes no reparo do osso (ZAMBUZZI et al., 2005). Com efeito, a quitosana (LEE et al., 2002), a medula óssea autógena e o plasma rico em plaquetas já têm sido utilizados como medida terapêutica complementar em cirurgias ortopédicas veterinárias para estimular a formação óssea em defeitos e no tratamento de atrasos de consolidação (MARTINS et al., 2013; GUERREIRO et al., 2014; KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

3. Hipótese

É esperado que os grupos tratados (medula óssea, plasma rico em plaquetas e quitosana) apresentem melhor desempenho global (como intensidade e formação de edema no membro operado, deambulação e avaliações radiográficas) em comparação ao grupo controle. E dentre os biomateriais, acredita-se que a medula óssea apresentará menor tempo de consolidação óssea.

4. Objetivos

4.1 Gerais

- Avaliar a consolidação óssea após a realização da técnica de osteossíntese minimamente invasiva com placa bloqueada associada à aplicação percutânea dos biomateriais plasma rico em plaquetas, concentrado de medula óssea ou gel de quitosana, na tíbia de cães.

4.2 Específicos

- Avaliar a consolidação óssea por meio de exames clínicos, grau do edema e deambulação por meio de escores predefinidos;
- Avaliar a consolidação óssea por meio de exames radiográficos que avaliam a radiopacidade na linha de fratura (RLF), localização do calo ósseo periosteal (LCO), presença de ponte óssea (PPO), restabelecimento das corticais (RC), restabelecimento do canal medular (RCM), remodelamento do calo ósseo (RCO), volume do calo ósseo (VCO) e características da linha da fratura (EAR - escores de 1 a 6).
- Avaliar o índice de mineralização do calo ósseo formado por meio da densitometria óptica e comparar entre os grupos tratados.

5. Referências

AITA, M.A.; FERREIRA, C.H.V.; IBANEZ, D.S.; MARQUEZ, R.S.; IKEUTI, D.H.; MOTA, R. T.; CREDIDIO, M.V.; FUJIKI, E.N. Ensaio clínico randomizado de osteossíntese percutânea e minimamente invasiva das fraturas da extremidade distal do rádio. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.49, n.3, p.218–226, 2014.

BABST, R.; KHONG, K. Cirurgia minimamente invasiva. In: RUEDI, T.; BUCKLEY, R. E.; MORAN, C. G. **Princípios AO do tratamento de fraturas**. Porto alegre: Artmed, 2007. cap.3, p.222-235.

BALLABEN, N.M.R. **Osteossíntese minimamente invasiva com placa bloqueada nas fraturas de tíbia em cães**. 2014. 62f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2014.

BARONCELLI, B.A.; PEIRONE, B.; WINTER M.D.; REESE, D.J.; POZZI, A. Retrospective comparison between minimally invasive plate osteosynthesis and open plating for tibial fractures in dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v.25, n.5, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.3415/VCOT-11-07-0097>.

BEALE, B. S.; MCCALLY, R. Minimally invasive plate osteosynthesis: tibia and fibula. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 42, p. 1023-1044, 2012.

COLLINGE, C.A.; SANDERS, R.W. Percutaneous plating in the lower extremity. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, n.8, p.211-216, 2000.

DÉJARDIN, L.M.; GUIOT, L.P.; VON PFEIL, D.J.F. Interlocking Nails and Minimally Invasive Osteosynthesis. **Veterinary Clinical and Small Animal**, v.42, p.935–962, 2012.

FLÔRES, L. N. **Osteossíntese minimamente invasiva com placa (MIPO) sem radiografias transoperatórias no tratamento de fraturas em ossos longos em cães e gatos**. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

GIL, M.H; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. **Química** **100**, p.72-74, 2006.

GUERREIRO, J.P.F.; DANIELI, M.V.; QUEIROZ, A.O.; DEFFUNE, E.; FERREIRA, R.R. Plasma rico em plaquetas (PRP) aplicado na artroplastia total do joelho. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v.xxx, n.xx, p.1-9, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2014.05.005>>. Acessado em: 27 abr. 2015.

GUIOT, L.P.; DÉJARDIN, L.M. Prospective evaluation of minimally invasive plate osteosynthesis in 36 nonarticular tibial fractures in dogs and cats. **Veterinary Surgery**, v. 40, p. 171-182, 2011.

GUZMÁN, R.; NARDECCHIA, S.; GUTIÉRREZ, M.C.; FERRER, M.L.; RAMOS, V.; MONTE, F.D.; ABARRATEGI, A.; LÓPEZ-LACOMBA, J.L. Chitosan Scaffolds Containing Calcium Phosphate Salts and rhBMP-2: In Vitro and In Vivo Testing for Bone Tissue Regeneration. **PLoS ONE**, v.9, n.2, e87149, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0087149.

HUDSON, C.C.; POZZI, A.; LEWIS, D.D. Minimally invasive plate osteosynthesis: Applications and techniques in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Orthopaedics Traumatology**, v.22, n.3, p.175-182, 2009. doi:10.3415/VCOT-08-06-0050.

HULSE, D. MIPO Techniques for the humerus in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.42, p.975–982, 2012.

KOCH, D. Implants: description and application. In: Ann L Johnson John EF Houlton Rico Vannini. **AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat**. Switzerland: Copyright, 2005. Cap. 2. p.27-50.

KRAUS, K.H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.*, v.32, p.232-242, 2006.

KREGOR, P.; STANNARD, J.A.; ZLOWODZKI, M.; COLE, P.A. Treatment of distal femur fractures using the less invasive stabilization system: surgical experience and early clinical results in 103 fractures. **Journal of Orthopaedics Trauma**, v.18, n.8, p.509-520, 2004.

KRETTEK, C.; MULLER, M.; MICLAU, T. Evolution of minimally invasive plate osteosynthesis (MIPO) in the femur. **Injury**, n.32, (Suppl 3), p.SC14–23, 2001.

LEE, J.; NAM, S.; IM, S.; PARK, Y. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. **Journal of Controlled Release**, v.78, p.187 – 197, 2002.

LINS, C.F.; HARTMANN, L.G.C.; ROSENFELD, A. A aplicação de plasma rico em plaquetas (prp) em lesões musculoesqueléticas – revisão de literatura. **News: Artigos Cetrus**, v.57, p.1-16, 2014.

MARTINS, E.A.N.; INVERNIZZI, M.S.; CAMPOS, M.G.N.; TEODORO, P.A.; CONTIERI, M.B.; SILVA, L.C.L.C. Emprego de membrana de quitosana em feridas cutâneas induzidas experimentalmente em equinos. **Ciência Rural**, v.43, n.10, p.1824-1830, 2013.

OLIVEIRA, G. Instrumental, material e procedimentos básicos para redução e fixação de fraturas. In: TUDURY, E.; POTIER, G.M.A. **Tratado de Técnica Cirúrgica Veterinária**. MedVet: São Paulo, 2009. cap. 22, p. 377-397.

PEIRONE, B.; ROVESTI, G. L.; BARONCELLI, A. B.; PIRAS, L. Minimally invasive plate osteosynthesis fracture reduction techniques in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal**, v. 42, p. 873-895, 2012.

PERREN, S.M. Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.84, n.8, p.1093–110, 2002.

PERREN, S.M. Biological internal fixation interface between biology and biomechanics. **European Cells and Materials**, v.5, Suppl.2, p.22-23, 2003.

PERRI DE CARVALHO, P.S.; LUPPINI, F.; BASSI, A.P.F. Biomateriais utilizados em implantodontia. In: Gomes LA. **Implantes Osseointegrados: técnica e arte**. São Paulo: Santos, 2002. p. 77-92.

SCHMOKEL, H.G.; STEIN, S.; RADKE, H.; HURTER, K.; SCHAWALDER, P. Treatment of tibial fractures with plates using minimally invasive percutaneous osteosynthesis in dogs and cats. **Journal Small Animal Practice**, n.48, p.157–160, 2007.

VAZ, C.E.S.; GUARNIERO, R.; SANTANA, P.J. Avaliação de concentrado osteogênico de medula óssea na consolidação de fraturas em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.18, n.6, p.321-6, 2010.

ZAMBUZZI, W.F.; NEVES, MC.M.; OLIVEIRA, R.C.; SILVA, T.L.; CESTARI, T.M.; BUZALAF, M.A.R.; TAGA, R.; TAGA, E.M. Reação tecidual e perfil de fosfatases após o implante de matriz óssea desmineralizada xenogênica em músculo de ratos. **Ciência Odontológica Brasileira**, São José dos Campos, v. 8, n. 2, p. 90-98, 2005. doi: ojs.fosjc.unesp.br/index.php/cob/article/download/393/320.

CAPÍTULO 2 – Plasma rico em plaquetas, medula óssea ou quitosana na osteossíntese minimamente invasiva com placa da tíbia de cães

Normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Anexo 1)

RESUMO – Objetivou-se avaliar por meio de exames clínicos, radiográficos e de densitometria óptica a consolidação óssea obtida da osteossíntese minimamente invasiva com placa bloqueada na tíbia de cães associada à aplicação percutânea dos biomateriais plasma rico em plaquetas (PRP), concentrado autólogo de medula óssea (MO) ou gel de quitosana (QUI). Foram utilizados trinta cães apresentando fraturas da tíbia e atendidos na rotina cirúrgica de um Hospital Veterinário. Os grupos foram formados de acordo com o biomaterial injetado sendo: grupo 1 (nada foi injetado), grupo 2 (MO), grupo 3 (PRP) e grupo 4 (QUI). Foram injetados 2 mL de cada biomaterial no foco da fratura, imediatamente após o procedimento de osteossíntese minimamente invasiva com placa bloqueada. Os animais foram avaliados quanto a intensidade de formação do edema, atividade deambulatória, exames radiográficos e densitometria óptica no momento imediato após a cirurgia e 15, 30, 60, 90 e 120 dias pós-operatórios. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação ao edema e deambulação. Setenta por cento dos animais operados nos diversos grupos apresentaram apoio grau 4 ou 5 do membro aos 15 dias de pós-operatório. Dentre os grupos (1, 2, 3 e 4) não se observou diferença estatística quanto ao uso do membro, entretanto o grupo 2 foi o que apresentou maior porcentagem (60%) de animais sem claudicação aos 15 dias. Houve diferença quanto ao momento da consolidação, ocorrendo mais cedo no grupo 2 (46,87 dias). Não houve diferença estatística na densidade mineral do calo ósseo formado entre os grupos e os momentos avaliados. Os biomateriais PRP, MO e QUI associados a MIPO contribuem na consolidação óssea na tíbia de cães. O concentrado de medula óssea promove consolidação óssea mais precoce.

Palavras-chave: aplicação percutânea, biologia da fratura, biomateriais, consolidação óssea.

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate through clinical, radiographic and optical densitometry bone regeneration obtained from minimally invasive osteosynthesis with locking plate in the tibia of dogs associated with percutaneous application of platelet rich plasma (PRP) biomaterials, centrifuged autologous bone marrow (MO) or chitosan gel (QUI). Thirty dogs from the surgical routine of the Veterinary Teaching Hospital presenting tibial fractures were used. The groups were formed according to injected biomaterial: group 1 (nothing was injected), group 2 (MO), group 3 (PRP) and group 4 (QUI). Two milliliters of each biomaterial was injected into the fracture site percutaneously just after the surgery. The dogs were evaluated for the intensity of edema formation (EDE), ambulatory activity (DEAM), radiographs and optical densitometry, immediately after surgery and 15, 30, 60, 90 and 120 days postoperatively. There was no significant difference between groups considering EDE and DEAM. Seventy percent of the animals presented member support (grade 4 or 5) at 15 days postoperatively. After 30 days, all dogs presented without lameness. Among the groups, there was no statistical difference in the walk, however the group 2 showed the highest percentage (60%) without lameness at 15 days. There was a difference considering clinical union in the group 2 (46.87 days). There was no statistical difference in the mineral density of the bone callus formed between the groups and the moments assessed. The PRP, BM and CHI associated with MIPO helped bone regeneration in the treatment of tibial fractures in dogs. Bone marrow group presented shorter bone healing time.

Keywords: biomaterials, bone healing, dog, percutaneous application.

Introdução

A osteossíntese minimamente invasiva com placa um conceito moderno de fixação, que tem por objetivo preservar o ambiente biológico, de modo a maximizar o potencial de cicatrização óssea e do tecido mole lesionado, facilitar a rápida recuperação da função do membro e reduzir a dor pós-cirúrgica em fraturas dos ossos longos em cães e gatos (Leung, 2008). Essa técnica segue os princípios da fixação biológica interna (Krettek et al., 2001), sendo uma das técnicas mais reportadas nos últimos anos (Baroncelli et al., 2012; Pozzi et al., 2013; Yanez et al., 2014).

Os biomateriais são substâncias desenvolvidas com o propósito de tratar, aumentar ou substituir de forma parcial ou total diversas partes do organismo, sendo formados por um ou mais materiais (Perri de Carvalho et al., 2002; Gil e Ferreira, 2006). No caso das fraturas ósseas, eles possuem a função de estimular uma consolidação precoce ou ainda minimizar danos por manobras inadequadas ou atrasos na consolidação que poderiam ocorrer devido a traumas excessivos de manipulação durante o procedimento cirúrgico.

Recentemente, as pesquisas utilizando medula óssea (Vaz et al., 2010), plasma rico em plaquetas (Lins et al., 2014) e quitosana (Guzmán et al., 2014) como biomateriais osteoestimuladores têm aumentado. Isso porque esses materiais possuem vantagens, como fácil obtenção, simplicidade do procedimento para utilização e não requerimento de material especializado.

Esses biomateriais possuem uma característica comum de poderem ser aplicados por via percutânea, uma vez que sua consistência é compatível com seringa e agulha. A essa técnica dar-se o nome de aplicação ou injeção percutânea e apresenta algumas vantagens, como facilidade na aplicação, representam procedimentos rápidos, causam menos risco ao paciente e é minimamente invasivo (Connolly e Shindell, 1986).

Considerando-se as potenciais complicações associadas com a cirurgia ortopédica, muitas vezes de difícil resolução ou mesmo desastrosas, têm se buscado incessantemente por formas de facilitar ou potencializar o processo de consolidação óssea. Neste sentido, o emprego de biomateriais aplicados percutaneamente no reparo de partes danificadas do tecido ósseo tem sido alvo de diversas pesquisas na ortopedia veterinária. Além disso, na literatura consultada não há pesquisas utilizando a osteossíntese minimamente invasiva com placa associada a aplicação percutânea de biomateriais.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar por meio de exames clínicos, radiográficos e densitometria óptica, a consolidação óssea obtida da osteossíntese minimamente invasiva com placa bloqueada na tíbia de cães associada à aplicação percutânea dos biomateriais plasma rico em plaquetas, concentrado de medula óssea ou quitosana.

Material e métodos

Delineamento experimental

Todos os procedimentos realizados foram previamente submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Câmpus de Jaboticabal, e aprovado de acordo com os preceitos éticos estabelecidos para os animais de experimentação com o número de protocolo 017930/12.

Foi realizado um estudo prospectivo de 48 cães com fraturas de tíbias provenientes da rotina clínico-cirúrgica do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, atendidos e acompanhados durante o período de março de 2012 a maio de 2015.

Os critérios de inclusão foram aqueles cães jovens ou adultos que apresentaram fratura da tíbia, associada ou não a fratura da fíbula, em especial fraturas cominutivas ou com mais de um segmento fraturado, com até dez dias após o trauma.

Os animais que apresentaram sinais evidentes de desnutrição (escore corporal baixo, desidratação, anorexia, apatia), ou outra afecção sistêmica que pudesse comprometer a consolidação óssea como disfunções renais, cardíacas e hormonais, fraturas expostas de qualquer grau, animais que não compareceram aos retornos propostos ou que morreram durante o período da pesquisa foram excluídos. Estes compuseram no total de 18 animais.

Quatro grupos experimentais foram formados, aleatoriamente, cada um composto por oito animais, com exceção do grupo 4 que apresentava seis, sendo eles:

Grupo 1 – representado pelos animais no quais foram realizadas as osteossínteses minimamente invasivas com placa bloqueada e nada foi injetado no foco da fratura, sendo este o grupo controle;

Os demais foram constituídos por cães submetidos às osteossínteses minimamente invasivas com placa bloqueada, e em cada grupo foi injetado um biomaterial diferente, sendo eles:

Grupo 2 – injeção do concentrado de medula óssea;

Grupo 3 – injeção de plasma rico em plaquetas;

Grupo 4 – injeção do gel de quitosana.

Foram utilizadas placas retas (Cãomédica, Campinas, São Paulo) de aço inoxidável do mesmo fabricante, com sistema de bloqueio dos parafusos, disponíveis nos sistemas 2, 2.7, 3.5 e 4.5 mm, sendo o tamanho escolhido conforme o peso corporal e estrutura óssea do paciente.

Preparo dos biomateriais

Preparação do concentrado de medula óssea

Foram colhidos 10 mL de medula óssea do tubérculo maior do úmero com seringas previamente heparinizadas. A amostra foi processada em Centrífuga (Centrífuga Baby - Modelo 206, Fanem, São Paulo, SP) a 1500 rotações por minuto (RPM) durante 10 minutos para concentrar as células mononucleares, conforme citado por Del Carlo et al. (2004). Após a centrifugação, o plasma sobrenadante foi descartado e o concentrado medular levado ao centro cirúrgico para utilização na osteossíntese. Foi também realizada a contagem das células nucleadas em câmara de Neubauer de amostras de 0,5 mL de medula óssea antes e após a centrifugação para comparação. Para contagem as amostras foram diluídas em solução de Turk.

Preparação do plasma rico em plaquetas

O protocolo para preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) seguiu a metodologia descrita por Aleixo et al. (2011). Foi colhido, de cada paciente, um frasco de sangue de 4,5 mL contendo citrato de sódio (Tubos de coleta a vácuo com citrato de sódio a 3,2%, Labor Import, Osasco/SP). As amostras passaram por duas centrifugações. A primeira centrifugação a 1200 RPM por 10 minutos, no qual todo o plasma e a zona de névoa foram aspirados, transferidos para um tubo estéril sem aditivo e concentrados pela segunda vez, agora a 1600 RPM por 10 minutos. Em seguida, descartou-se aproximadamente 80% do sobrenadante, permanecendo apenas a parte mais concentrada em plaquetas e o botão plaquetário que se encontrava no fundo do tubo. Para ativação plaquetária, os tubos foram levemente agitados e foi adicionado cloreto de cálcio (Cloreto de cálcio 10%, Injectcenter, Ribeirão Preto/SP).

Preparação do gel de quitosana

O gel foi obtido de acordo com o procedimento proposto por Chenite et al. (2000). Para tanto, 200 mg de quitosana (com alto peso molecular e grau de desacetilação superior a 75% (Sigma-Aldrich, CAS Number: 9012-76-4) foram dissolvidos em 9 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 M. À solução resultante, foram adicionados, lentamente e sob agitação, 560 mg de fosfato de glicerol dissódico (Glycerol phosphate disodium salt hydrate – Sigma-Aldrich, CAS Number: 55073-41-1), previamente dissolvidos em 1 mL de água destilada, o que levou à formação de gel esbranquiçado. Após o preparo, o gel foi submetido à esterilização em autoclave e conservação à temperatura ambiente média de 25 °C, para posterior aplicação de 2 mL no foco da fratura.

Procedimento cirúrgico

Os pacientes receberam medicação pré-anestésica (MPA) por meio da aplicação intramuscular de cloridrato de clorpromazina (Longactil 25 mg/ml, Cristália, Produtos Químicos Farmacêutica Ltda, Itapira/SP) (0,3 mg/kg) e Morfina (Dimorf 10 mg/ml, Cristália, Produtos Químicos Farmacêutica Ltda, Itapira/SP) (0,25 mg/kg). Aguardou-se 20 minutos e com o paciente já sob efeito da MPA, foi realizada a venóclise com cateter de tamanho adequado a cada paciente. Após tricotomia ampla do membro fraturado e região lombossacral, os pacientes foram encaminhados imediatamente ao centro cirúrgico. Ato contínuo foi realizada indução anestésica com o agente Propofol (Profol 1%, Cristália, Produtos Químicos Farmacêutica Ltda, Itapira/SP) (4 mg/kg IV), intubação orotraqueal com sonda e manutenção da anestesia com uma mistura de isoflurano e oxigênio a 100%. Em seguida, o animal foi posicionado para anestesia local epidural com lidocaína (Xylocaína 2%, Hipolabor Farmacêutica Ltda, Sabará/MG) sem vasoconstritor 2% (4 mg/kg) associada à bupivacaína (Neocaína 0,75%, Cristália, Produtos Químicos Farmacêutica Ltda, Itapira/SP) 0,75% sem vasoconstritor (2 mg/kg) e cloridrato de tramadol (Tramal 5%, Hipolabor Farmacêutica Ltda, Sabará/MG) (0,5 mg/kg) no espaço entre sétima vértebra lombar e primeira vértebra sacral (L7-S1).

Com o paciente em decúbito dorsal, foi realizada antissepsia do membro e posteriormente foram aplicados panos cirúrgicos de tecido estéreis. A fratura foi reduzida de maneira fechada e indireta, com o mínimo de manipulação. O alinhamento e comprimento ósseo foram atingidos com base nas referências anatômicas do próprio membro e comparação com o membro contralateral, sem uso de intensificadores de imagem. O acesso cirúrgico foi restrito a duas pequenas incisões na face medial da tíbia, sendo uma proximal e uma distal ao foco de fratura. A placa foi inserida através da incisão proximal e então deslizada pelo túnel de tecidos moles adjacentes à superfície do osso, sobre o local da fratura. Após o adequado posicionamento da placa sobre a superfície óssea, foram realizados os orifícios para a aplicação dos parafusos bloqueados, com o auxílio de um guia de perfuração e uma broca longa. A quantidade necessária de parafusos a ser colocada foi definida de acordo com cada fratura. Após a colocação dos parafusos, a ferida cirúrgica foi suturada em três camadas três camadas, sendo o utilizado o fio poliglecaprone 2-0 para a sutura de musculatura e redução do espaço morto (subcutâneo) com o padrão simples contínuo em ambas, e o fio de náilon 3-0 foi utilizado para o padrão simples separado na sutura de pele.

Após a sutura de pele, colocou-se uma agulha calibre 40x12mm (Agulha 40x12mm, Becton Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda, Curitiba/PR) por via percutânea através de palpação dentro da falha óssea no foco da fratura e, de acordo com o grupo de cada animal, foi injetado de uma só vez 2 mL de cada biomaterial. No grupo controle nada foi injetado.

Cuidados pós-operatórios

Foram prescritos antibiótico cefalexina (Cefalexina, Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo/SP) (dose de 25 mg/kg, a cada 12 horas, durante 10 dias) anti-inflamatório meloxicam (Maxicam injetável 0,2%, Ouro Fino Saúde Animal Ltda., Cravinhos/SP) na dose de 0,2 mg/kg no primeiro dia e 0,1 mg/kg nos demais dias, a cada 24 horas) durante três dias, e por último dipirona (Dipirona sódica, Laboratório Geyer, Porto Alegre/RS, na dose de 25 mg/kg a cada oito horas por sete dias) e cloridrato de tramadol (Tramal 5%, Hipolabor Farmacêutica Ltda, Sabará/MG, na dose de 3 mg/kg a cada oito horas por cinco dias) como analgésicos. Também foi

recomendada limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica (Solução fisiológica cloreto de sódio a 0,9%, Química Farmacêutica Gaspar Viana S.A., São Paulo/SP) e aplicação tópica de rifamicina (Rifocina spray, Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda, Suzano/SP), uma vez ao dia durante 15 dias. As suturas cutâneas foram removidas no décimo quinto dia de pós-operatório.

Avaliações pós-operatórias

Os pacientes foram avaliados clinicamente e radiograficamente, sempre pelo mesmo avaliador, antes da cirurgia (Momento 0 – M0), e após 15 dias (M15), 30 dias (M30), 60 dias (M60), 90 dias (M90), e 120 dias (M120) da cirurgia.

A intensidade do edema foi classificada em escores adaptados de Dallabrida (2004), sendo nulo (escore 0) quando não há aumento de volume no local da cirurgia, discreto (1) quando há aumento de volume no local da cirurgia, moderado (2) quando há aumento no local da cirurgia e na região fraturada da tíbia e grave (3) quando há aumento de volume no local da cirurgia, região da tíbia e porção distal do membro.

A deambulação foi classificada em escores adaptados de Dallabrida (2004), sendo grau 1, quando o animal não se mantém em posição quadrupedal; grau 2, animal em posição quadrupedal, porém sem o apoio do membro; grau 3, apoio do membro, mas sem sua utilização ao caminhar; grau 4, uso claudicante do membro ao caminhar e, grau 5 com a utilização do membro sem claudicação.

Exames radiográficos sequenciais, nas projeções craniocaudal e mediolateral, foram realizados no período pós-operatório imediato e após 15, 30, 60, 90 e 120 dias do procedimento cirúrgico. Para avaliação do processo de consolidação óssea, as radiografias foram analisadas quanto às variáveis: radiopacidade na linha de fratura (RLF), localização do calo ósseo periosteal (LCO), presença de ponte óssea (PPO), restabelecimento das corticais (RC), restabelecimento do canal medular (RCM), remodelamento do calo ósseo (RCO), volume do calo ósseo (VCO) e características da linha da fratura (EAR - escores de 1 a 6), descritas e adaptadas de Sena (2006) e Souza et al. (2011).

Utilizou-se um densímetro digital MRA para obtenção do Índice de Mineralização (IM) do calo ósseo formado na fratura. Para tal, gerou-se duas equações $y = ax + b$, onde $b = y_1$ e $a = \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0}$, obtidas de um gráfico linear de

descrito por Moraes (2002). A área mais radiodensa e a área menos radiodensa em cada radiografia foram submetidas à avaliação densitométrica e os valores obtidos aplicados na fórmula matemática, obtendo-se assim o valor de *a* e *b*. Em seguida, o valor médio da DO, de cada radiografia, foi inserido nesta fórmula matemática de forma que, o valor de *x* encontrado correspondeu ao índice de mineralização da radiografia observada, obtendo-se valores para IM na projeção craniocaudal (IMCC) e IM na projeção mediolateral (IMML).

Análise estatística

O delineamento utilizado para análise das variáveis estudadas (EDE, DEAM, RLF, LCO, PPO, RC, RCO, RCM, VCO, EAR, IMCC, IMML) foi de parcelas subdivididas com medidas repetidas no tempo, testando o fator tratamento (4 níveis) nas parcelas e o fator momento (6 níveis) nas subparcelas, com 5 repetições por tratamento. O quadrado médio de animal dentro de tratamento foi usado como resíduo para testar o efeito de tratamento. Quanto às variáveis discretas, ou seja, todas exceto IMCC e IMML, estas foram antes das análises de variância, transformadas em $\sqrt[2]{\text{resposta} + 1}$. Havendo diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey no mesmo nível de significância (5%). Para as referidas análises foi utilizado o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary NC, USA).

Resultados

Dos trinta animais estudados, 40% tinham menos que 12 meses de idade, 57% eram sem raça definida, 43% de diversas raças (Blue Heeler, Border Collie, Dachshund, Fila Brasileiro, Labrador Retriever, Pinscher e Poodle), e 46 % machos e 54% fêmeas. A diáfise foi a região tibial mais afetada correspondendo a 85% das fraturas. As fraturas encontradas foram: 63% entre transversas e oblíquas, 10 % de configurações em espiral e 27% de cominutivas. Com relação ao peso, 47% dos animais era de pequeno porte (1 a 10 kg), 26,5% de médio porte (11 a 20 kg) e 26,5% de grande porte (21 a 50 kg).

Entre os grupos, a idade foi homogênea no grupo 1 (controle) e no 2 (medula óssea) no qual 50% tinham menos e 50% tinham mais de 12 meses de idade. O grupo

3 (plasma rico em plaquetas) apresentou 75% com mais de 12 meses e 25% com menos e, o grupo 4 (quitosana) apresentou 67% dos animais com mais de 12 meses e 33% com menos.

Os tipos de fraturas dentro de cada grupo foram heterogêneos no qual o grupo 1 apresentou 37,5% fraturas do tipo A, 25% B e 37,5% C. O grupo 2 obteve 75% do tipo A, 12,5% B e 12,5% C. O grupo 3 apresentou 50% do tipo A e 50% do tipo C, e o grupo 4 apresentou 100% do tipo A.

Não houve diferença estatística no edema e na atividade deambulatória entre os grupos. No presente trabalho, 70 % dos animais operados nos diversos grupos apresentaram apoio claudicante do membro ao caminhar (grau 4) ou uso do membro sem claudicação (grau 5) aos 15 dias de pós-operatório. No M30, todos os animais não apresentavam claudicação do membro (grau 5).

Dentre os grupos (1, 2, 3 e 4) não se observou diferença estatística quanto ao uso do membro, entretanto o grupo 2 foi o que apresentou maior porcentagem (60%) de apoio aos 15 dias (com grau 5 - uso do membro sem qualquer restrição).

Os resultados estatísticos das variáveis radiográficas e de densitometria óptica: radiopacidade da linha da fratura (RLF), localização do calo ósseo periosteal (LCO), presença de ponte óssea (PPO), restabelecimento das corticais (RC), remodelamento do calo ósseo (RCO), volume do calo ósseo (VCO), índice de mineralização na projeção craniocaudal (IMCC) e índice de mineralização na projeção mediolateral (IMML) não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos 1, 2, 3 e 4. Entretanto, as variáveis restabelecimento do canal medular (RCM) e escala de avaliação radiográfica (EAR) apresentaram-se estatisticamente diferentes no grupo 2 em relação ao demais (Tab. 1 e 2).

Tabela 1. Médias e desvio padrão da variável RCM (restabelecimento do canal medular) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva.

Médias e desvio padrão da variável RCM (restabelecimento do canal medular)						
Grupos	Momentos					
	0	15	30	60	90	120
1	2.00±0.0	2.00±0.0	2.00±0.0	1.50±0.54	1.14±0.37*	1.12±0.35
2	2.00±0.0	1.75±0.46	1.25±0.46*	1.00±0.0	1.00±0.0	1.00±0.0
3	2.00±0.0	1.85±0.37	1.62±0.51	1.14±0.37*	1.00±0.0	1.00±0.0
4	2.00±0.0	1.83±0.40	1.83±0.40	1.33±0.51*	1.20±0.44	1.00±0.0

*Houve diferença estatística significativa entre os grupos 1, 2, 3 e 4 pelo Teste de Tukey a 5%.

Tabela 2. Média dos momentos (M15, M30, M60, M90 e M120) de consolidação clínica de acordo com a escala de avaliação radiográfica (EAR) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva.

Média dos momentos de consolidação clínica da fratura de acordo com a EAR									
Grupo	Animais								Média (Dias)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
1	90	60	30	120	15	90	60	90	69.37
2	30	15	60	60	30	120	30	30	46.87*
3	120	30	60	30	90	90	60	60	67.50
4	60	60	30	90	90	15	.	.	57.50

*Houve diferença estatística significativa entre os grupos 1, 2, 3 e 4 pelo Teste de Tukey a 5%.

A Figura 1 mostra imagens radiográficas do alinhamento ósseo atingido nos pacientes que foram submetidos a técnica de MIPO, bem como a evolução radiográfica da consolidação óssea em um cão de cada grupo experimental.

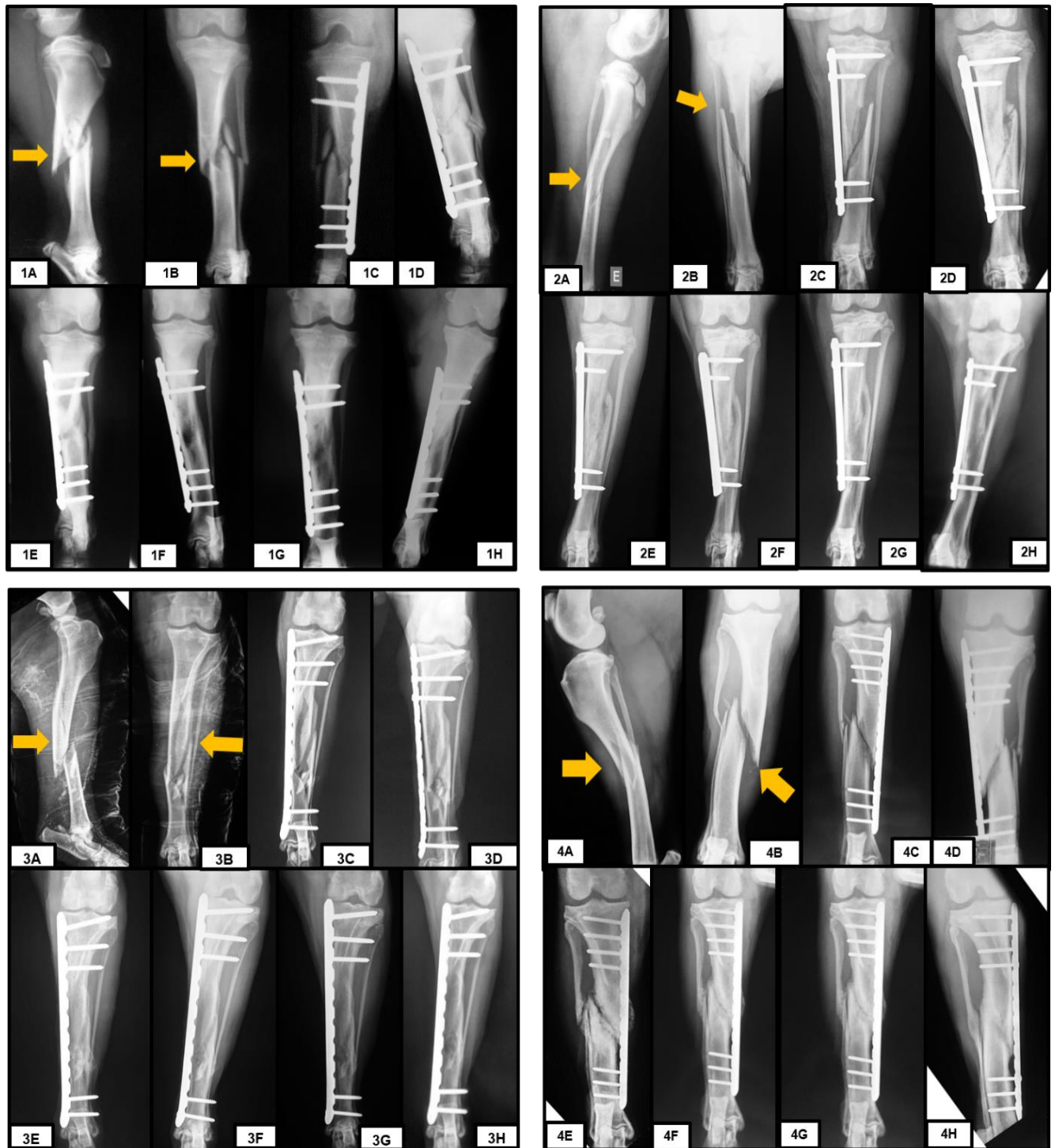


Figura 1. Imagens fotográficas das radiografias no período experimental. **1.** Paciente de número 3 do grupo 1 (controle) na projeção craniocaudal. **1A:** Fratura cominutiva em terço médio da tibia (seta) em projeção mediolateral; **1B:** Projeção craniocaudal indicando a fratura cominutiva (seta); **1C:** Pós-operatório imediato com bom alinhamento do eixo ósseo; **1D:** 15 dias de pós-operatório com início de formação do calo ósseo; **1E:** 30 dias de pós-operatório

com união clínica da fratura; **1F**: 60 dias de pós-operatório; **1G**: 90 dias de pós-operatório; **1H**: 120 dias de pós-operatório com remodelamento ósseo. **2**. Paciente de número 8 do grupo 2 (medula óssea) na projeção craniocaudal. **2A**: Fratura oblíqua longa em terço médio da tíbia (seta) em projeção mediolateral; **2B**: Projeção craniocaudal indicando a fratura oblíqua longa (seta); **2C**: Pós-operatório imediato com bom alinhamento do eixo ósseo; **2D**: 15 dias de pós-operatório com início de formação do calo ósseo; **2E**: 30 dias de pós-operatório com união clínica da fratura; **2F**: 60 dias de pós-operatório; **2G**: 90 dias de pós-operatório; **2H**: 120 dias de pós-operatório. **3**. Paciente de número 8 do grupo 3 (plasma rico em plaquetas) na projeção craniocaudal. **3A**: Fratura cominutiva em terço médio da tíbia (seta) em projeção mediolateral; **3B**: Projeção craniocaudal indicando a fratura cominutiva (seta); **3C**: Pós-operatório imediato com bom alinhamento do eixo ósseo; **3D**: 15 dias de pós-operatório com início de formação do calo ósseo; **3E**: 30 dias de pós-operatório com união clínica da fratura; **3F**: 60 dias de pós-operatório; **3G**: 90 dias de pós-operatório; **3H**: 120 dias de pós-operatório com remodelamento ósseo. **4**. Paciente de número 5 do grupo 4 (quitosana) em projeção craniocaudal. **4A**: Fratura oblíqua longa em terço médio da tíbia (seta) em projeção mediolateral; **4B**: Projeção craniocaudal indicando a fratura oblíqua longa (seta); **4C**: pós-operatório imediato com bom alinhamento do eixo ósseo; **4D**: 15 dias de pós-operatório; **4E**: 30 dias de pós-operatório; **4F**: 60 dias de pós-operatório; **4G**: 90 dias de pós-operatório com união clínica da fratura; **4H**: 120 dias de pós-operatório com remodelamento ósseo.

Como complicações, um animal do grupo controle apresentou reação inflamatória ao fio de sutura (poliglecaprone 25) que foi substituído, posteriormente, por fio de náilon. Outro animal do mesmo grupo apresentou falha do implante aos 60 dias de pós-operatório com quebra do parafuso mais proximal, esperou-se a consolidação óssea que ocorreu aos 120 dias. Entretanto nesse momento, houve exposição da placa óssea, sendo esta retirada e, foi colocada uma imobilização externa rígida no animal por 15 dias. Outra complicação foi a inserção de um parafuso na articulação tibiotársica em um animal do grupo 3 (plasma rico em plaquetas).

Discussão

A tíbia é um dos ossos longos que mais se adequa a técnica da osteossíntese minimamente invasiva, visto a anatomia permitir fácil acesso a superfície medial para aplicação da placa, e a escassa cobertura muscular contribuir para a redução de fratura, sem muitas vezes utilizar intensificadores de imagem. Entretanto, essas características também favorecem uma grande ocorrência de complicações de fraturas quando da utilização de outras técnicas de redução, principalmente reconstrução anatômica. Assim, uma abordagem minimamente invasiva a fraturas tibiais é de grande importância para ortopedia veterinária.

Os princípios da osteossíntese minimamente invasiva são melhor aplicados nas fraturas em que não se consegue reconstruir a coluna óssea, ou seja, em fraturas complexas e cominutivas, muitas delas com grande lesão aos tecidos moles, mas não existe contraindicação de seu uso em outras configurações de fraturas, a não ser nas articulares as quais deve ser realizado a reconstrução anatômica (Hudson et al., 2009). Mesmo nestes casos pode se utilizar a MIPO com a orientação da fluoroscopia (Beale e Mccally, 2012). No presente estudo, utilizou-se a técnica da MIPO para correção tanto de fraturas cominutivas complexas como para as mais simples como as oblíquas e obteve-se sucesso no tratamento, corroborando com Schmökel et al. (2007), Baroncelli et al. (2012) e Adelina et al. (2013). No entanto, Hudson et al. (2012) e Beale e Mccally (2012) citaram que se pode usar do artifício da MIPO para traçados simples de fraturas, tendo o cuidado de inserir parafusos mais proximais à linha de fratura.

No presente trabalho não se utilizou do artifício de radiografias transoperatórias ou fluoroscopia para visibilização dos fragmentos durante os procedimentos, obtendo consolidação óssea em todas as configurações de fraturas operadas até mesmo nas de traçados mais simples. Muitos trabalhos realizados fora do Brasil (Hulse, 2012; Adelina et al., 2013) usa-se intensificadores de imagens como ferramenta indispensável, uma vez que permite observar várias projeções exatas e rápidas da superfície óssea, sendo o método mais útil para avaliar o alinhamento (Peirone et al., 2012).

A consolidação óssea obtida com a MIPO é a indireta ou secundária, ocorrendo por meio da formação de calo ósseo. Essa técnica obedece aos princípios de

osteossíntese biológica, em que se prefere preservar o ambiente da fratura em busca de consolidação mais rápida, ao mesmo tempo em que se pode perder um pouco do alinhamento mais adequado do membro (Perren, 2003). Apesar de ser uma técnica bastante recomendada, principalmente para fraturas irreduzíveis, alguns trabalhos citam que não há diferença significativa no tempo de consolidação óssea da MIPO em relação à técnica de redução aberta “open reduction and internal fixation” (ORIF) (Pozzi et al., 2013). Este trabalho citado possui a limitação de ser um estudo retrospectivo, não tendo acompanhamento clínico e radiográfico frequente e preciso para definir o tempo de união óssea, enquanto a presente pesquisa, foi realizada no modelo randomizado, com número de animais que permitem uma análise estatística e com acompanhamento clínico e radiográfico de todos os pacientes nos momentos 15, 30, 60, 90 e 120 dias após o procedimento cirúrgico.

A MIPO foi associada à aplicação percutânea de biomateriais, tais como enxerto autógeno de medula óssea centrifugada, plasma rico em plaquetas e o gel de quitosana no foco de fraturas tratadas para minimizar o tempo de consolidação óssea, trazendo menos morbidade ao paciente. Essas substâncias estimulam a regeneração dos tecidos ósseos e cartilagenosos por meio de um procedimento minimamente invasivo (Connolly e Shindell, 1986), de baixo custo e que necessita apenas de agulha e seringa para aplicação. Além disso, na literatura consultada não há trabalhos na literatura consultada que citam a aplicação percutânea de biomateriais associada a MIPO.

Verifica-se atualmente que a principal indicação de uso da aplicação percutânea de biomateriais é em casos de não união óssea, sendo considerado um método efetivo e seguro principalmente, quando se injeta o concentrado osteogênico de medula óssea (Hernigou et al., 2005). Os biomateriais foram injetados para avaliar a influência deles na consolidação óssea em fraturas recentes e nos resultados clínicos da pesquisa, tentando reduzir os índices de complicações que são comuns nas fraturas tibiais. Nesse estudo não se observou sinais de infecção óssea e apenas um paciente apresentou complicação de união da fratura, sendo verificada união retardada no paciente 4 do grupo controle em que não foi aplicado nenhum biomaterial no foco da fratura. Contrapondo o estudo de Pozzi et al. (2013) que obteve um animal

com osteomielite no seu grupo MIPO e um no grupo ORIF, sendo necessário a retirada da placa.

A MIPO favorece o retorno rápido a função do membro uma vez que diminui os danos aos tecidos moles, sendo vantajosa em relação à ORIF (Baroncelli et al., 2012). Dentre os grupos (1, 2, 3 e 4) não se observou diferença estatística quanto ao uso do membro, entretanto o grupo 2 foi o que apresentou maior porcentagem (60%) de apoio aos 15 dias (com grau 5 – sem claudicação). Isso porque a medula óssea apresenta propriedades osteogênicas e osteoindutoras, uma vez que possui em sua composição células tronco mesenquimais que podem se diferenciar em osteoblastos que irão agir no reparo e na formação óssea (Kraus e Kirker-Head, 2006). Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos, conferindo essa adequada deambulação a estabilidade alcançada com a técnica e implante utilizados.

O PRP tem sido muito utilizado em pesquisas e na rotina clínica na medicina veterinária em variadas áreas, especialmente na ortopedia (Guerreiro et al., 2014). A grande vantagem de se utilizar o PRP nas fraturas, é que ele fornece um ambiente favorável a consolidação tecidual, uma vez que seus α -grânulos, quando ativados, liberam fatores de crescimento, citocinas e estimulam a migração celular através da angiogênese e quimiotaxia (Alsousou et al., 2013).

A medula óssea centrifugada é um dos métodos que pode ser utilizado quando se quer concentrar de forma não fracionada as células tronco mesenquimais. Existem outros métodos mais eficientes que concentram uma quantidade maior de células tronco fracionadas da medula óssea, mas esses métodos exigem laboratório adequado para cultivo celular e alguns equipamentos e materiais que não estão disponíveis na maioria dos centros cirúrgicos de pequenos animais. Assim o aspirado de medula óssea, apesar de ter um moderado potencial osteogênico, é de fácil obtenção e confecção, necessitando de equipamentos mais simples, representando uma importante vantagem do seu uso em comparação ao cultivo de células tronco fracionadas (Vaz et al., 2010).

A quitosana foi utilizada neste trabalho na forma de gel o que propiciou sua aplicação percutânea. As vantagens desse tipo de aplicação de biomateriais consistem em menor morbidade ao paciente, na opção de carrear agentes terapêuticos e não conter substâncias residuais (Naderi et al., 2011). São escassos

os estudos randomizados com sua utilização em fraturas, sendo encontrados alguns trabalhos experimentais com tendões (Santana et al., 2014) e cartilagem (Martins, 2010).

O grupo 4 apresentou tempo de consolidação óssea semelhante aos grupos controle e 3, viabilizando-o na utilização em fraturas, além de sua fácil aplicabilidade. A quitosana possui a capacidade de ativar macrófagos, que por sua vez irão modular a consolidação e liberar citocinas e fatores de crescimento que auxiliam no processo de cicatrização tecidual (Gorzalanny et al., 2010).

As avaliações radiográficas foram importantes para o acompanhamento de sinais de consolidação óssea realizadas nos tempos pré-determinados para se obter avaliação mais fidedigna (Pozzi et al., 2013), sendo possível o acompanhamento para comparação da evolução do calo ósseo entre os grupos 1 (controle), 2, 3 e 4. Dentre as variáveis radiográficas analisadas, observou-se diferença estatística em RCM (restabelecimento do canal medular) e EAR (escala de avaliação radiográfica). Nestas o grupo 2 apresentou-se diferente estatisticamente dos grupos 1, 3 e 4, devido apresentar essas variáveis mais precocemente (M30).

A radiopacidade da linha de fratura iniciou como ausente, ou seja, o traçado da fratura foi visibilizado presente, à medida que foram avançando os momentos (M90 e M120), foi havendo uma formação de calo ósseo igualmente nos quatro grupos, que obviamente provocou a radiodensidade da linha de fratura. Ocorreu de forma semelhante com o restabelecimento do canal medular, que nos primeiros momentos (M0 e M15) não estavam presentes de forma geral nos grupos, no M30 estava presente no grupo 2 (MO), presente em metade dos animais do grupo 3 (PRP) e ausente nos grupos 1 e 4, havendo diferença significativa entre eles. No M60, M90 e M120 estavam presentes em todos, não havendo diferença significativa. A análise dessas variáveis constitui um dos critérios para auxiliar na visibilização da consolidação óssea que, segundo Guiot e Déjadin (2011) são muito importantes principalmente quando correlacionados com a deambulação clínica do paciente. À medida que houve restabelecimento do canal medular e das corticais, houve maior remodelamento ósseo, diminuição do volume calo ósseo e presença de ponte óssea que caracterizaram a consolidação das fraturas em todos os grupos.

A escala de avaliação radiográfica não demonstrou diferença estatística significativa quando comparada as médias entre os grupos 1, 2, 3 e 4, houve diferença quanto ao momento da consolidação, ocorrendo mais cedo no grupo 2 (MO) aos 46,87 dias. Esse tempo de consolidação é considerado precoce e ocorreu devido a associação de técnicas minimamente invasivas, a MIPO e a aplicação percutânea do concentrado de medula óssea que preservaram o ambiente biológico da fratura e ofereceram células tronco mesenquimais indiferenciadas para aumentar as chances de uma cicatrização tecidual mais rápida e com risco reduzidos de complicações. Esse tempo foi semelhante aos estudos de Guiot e Déjardin (2011), que relataram união clínica em 45 dias pós-operatório com a técnica da MIPO sem adição de adjuvantes para estimular a cicatrização.

Com relação ao índice de mineralização óssea obtido pelos valores de densitometria óptica são poucos os trabalhos que relatam sua utilização como auxílio na determinação da consolidação óssea das fraturas (Souza et al., 2011), uma vez que é importante para quantificar a concentração mineral óssea através de imagens radiográficas (Louzada et al., 1998), não havendo, porém, diferença entre os grupos estudados, ou indícios de osteopenia que indicassem alguma afecção óssea presente.

Conclusões

Os biomateriais plasma rico em plaquetas, medula óssea e quitosana contribuem na consolidação óssea associados à osteossíntese minimamente invasiva na tíbia de cães, sendo que o concentrado de medula óssea promove menor tempo de consolidação. Os escores radiográficos são essenciais para determinar o tempo de união clínica e consolidação da fratura, principalmente a escala de avaliação radiográfica. Não há diferença estatística na avaliação clínica e na densidade mineral do calo ósseo formado entre os grupos. A técnica da MIPO pode ser realizada adequadamente mesmo sem utilizar intensificadores de imagem. A quitosana não causa reação inflamatória ou complicações indesejáveis.

Agradecimentos

À Fundação de amparo a pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado (Processo FAPESP 2012/16712-7) e pelo auxílio à pesquisa (Processo FAPESP 2012/20642-4).

Referências

ADELINA, P.; DASCĂLU, R.; SCHUSZLER, L. et al. Assessment of Long Bone Fractures Healing Outgoing Minimally Invasive Plate Osteosynthesis in Dogs. *Vet. Med.*, v.70, n.2, p.293-300, 2013.

ALEIXO, G.A.S.; COELHO, M.C.O.C.; TEIXEIRA, M.N. et al. Comparação entre dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas, em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.3, p.567-573, 2011.

ALSOUSOU, J.; ALI, A.; WILLETT, K. et al. The role of platelet-rich plasma in tissue regeneration. *Platelets*, v. 24, n. 3, p. 173-182, 2013.

BARONCELLI, B.A.; PEIRONE, B.; WINTER M.D. et al. Retrospective comparison between minimally invasive plate osteosynthesis and open plating for tibial fractures in dogs. *Vet. Comp. Orthop. Traumat.*, v.25, n.5, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.3415/VCOT-11-07-0097>.

BEALE, B. S.; MCCALLY, R. Minimally invasive plate osteosynthesis: tibia and fibula. *Vet. Clinic. Am.: Small Anim Pract.*, v. 42, p. 1023-1044, 2012.

CHENITE, A.; CHAPUT, C.; WANG, D. et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, v. 21, n.21, p. 2155 – 2161, 2000.

CONNOLLY, J.; SHINDELL, R. Percutaneous marrow injection for nonunited tibia. *The Nebraska Med. J.*, v.71, p.105-107, 1986.

DALLABRIDA, A. L. *Osteossíntese femural em cães através de transfixação esquelética interna: proposição de técnica*. 2004. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; DAIBERT, A. P. S. et al. Medula óssea autógena. Uma alternativa de enxerto na ortopedia veterinária. *Revista Ceres*, v.51, n.295, p.411-418, 2004.

GIL, M.H; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. *Química 100*, p.72-74, 2006.

GORZELANNY, C.; PÖPPELMANN, B.; PAPPELBAUM, K. et al. Human macrophage activation triggered by chitotriosidase mediated chitin and chitosan degradation. *Biomaterials*, v.31, p.8556-8563, 2010.

GUERREIRO, J.P.F.; DANIELI, M.V.; QUEIROZ, A.O. et al. Plasma rico em plaquetas (PRP) aplicado na artroplastia total do joelho. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v.xxx, n.xx, p.1-9, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2014.05.005>>. Acessado em: 27 abr. 2015.

GUIOT, L.P.; DÉJARDIN, L.M. Prospective evaluation of minimally invasive plate osteosynthesis in 36 nonarticular tibial fractures in dogs and cats. *Vet. Surg.*, v. 40, p. 171-182, 2011.

GUZMÁN, R.; NARDECCHIA, S.; GUTIERREZ, M.C. et al. Chitosan Scaffolds Containing Calcium Phosphate Salts and rhBMP-2: In Vitro and In Vivo Testing for Bone Tissue Regeneration. *PLoS ONE*, v.9, n.2, e87149, 2014.

HERNIGOU, P.; POIGNARD, A.; MANICOM, O. et al. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J. Bone Joint Surg. [Br]*, v.87, p.896-902, 2005.

HUDSON, C.C.; POZZI, A.; LEWIS, D.D. Minimally invasive plate osteosynthesis: Applications and techniques in dogs and cats. *Vet. Comp. Orthop. Traumat*, v.22, n.3, p.175-182, 2009.

HUDSON, C.C.; LEWIS, D.D.; POZZI, A. Minimally Invasive Plate Osteosynthesis in Small Animals Radius and Ulna Fractures. *Vet. Clin. Small Anim.*, v.42, p.983–996, 2012.

HULSE, D. MIPO Techniques for the humerus in small animals. *Vet. Clinic. Am.: Small Anim Pract.*, v.42, p.975–982, 2012.

KRAUS, K.H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.*, v.32, p.232-242, 2006.

KRETTEK, C.; MULLER, M.; MICLAU, T. Evolution of minimally invasive plate osteosynthesis (MIPO) in the femur. *Injury*, n.32, (Suppl 3), p.SC14–23, 2001.

LEUNG, F.K. Implantes. In: TONG, G.O. *Manual de tratamento de fraturas da AO: osteossíntese com placa minimamente invasiva (MIPO)*. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap.4, p.49-61.

LINS, C.F.; HARTMANN, L.G.C.; ROSENFELD, A. A aplicação de plasma rico em plaquetas (prp) em lesões musculoesqueléticas – revisão de literatura. *News: Artigos Cetrus*, v.57, p.1-16, 2014.

LOUZADA, M.J.Q.; PELA, C.A.; BELANGER, W.D. et al. Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica. *RBE - Caderno de Engenharia Biomédica*, v.14, n.2, p.37-47, 1998.

MARTINS, E. A. N. *Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao glicerol fosfato para reparação de defeitos osteocondrais induzidos*

experimentalmente na tróclea do talus de eqüinos. 2010. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MORAES, P. C. *Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos*. 2002, 73 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

NADERI, H.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J. Biomat. Applicat.*, v. 26, p. 383-419, 2011.

PEIRONE, B.; ROVESTI, G. L.; BARONCELLI, A. B.; PIRAS, L. Minimally invasive plate osteosynthesis fracture reduction techniques in small animals. *Vet. Clinic. Am.: Small Anim Pract.*, v. 42, p. 873-895, 2012.

PERREN, S.M. Biological internal fixation interface between biology and biomechanics. *Europ Cells Mat.*, v.5, Suppl.2, p.22-23, 2003.

PERRI DE CARVALHO, P.S.; LUPPINI, F.; BASSI, A.P.F. Biomateriais utilizados em implantodontia. In: Gomes LA. *Implantes Osseointegrados: técnica e arte*. São Paulo: Santos, 2002. p. 77-92.

POZZI, A.; HUDSON, C.C.; GAUTHIER, C.M. et al. Retrospective Comparison of Minimally Invasive Plate Osteosynthesis and Open Reduction and Internal Fixation of Radius-Ulna Fractures in Dogs. *Vet. Surg.*, v.42, p.19–27, 2013. doi:10.1111/j.1532-950X.2012.01009.x.

SANTANA, C.C.; NÓBREGA NETO, P.I.; SÁ, M.J.C. et al. Utilização do filme de quitosana na reparação de tendão em coelhos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.4, pp. 995-1002, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-652>

SCHMOKE, H.G.; STEIN, S.; RADKE, H. et al. Treatment of tibial fractures with plates using minimally invasive percutaneous osteosynthesis in dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.*, n.48, p.157–160, 2007.

SENA, M. P. T. *Fratura tibial e fibular de cão tratada com grampo de aço associado à cerclagem completa comparado à fixação com placa de neutralização*. 2006, 41 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SOUZA, T.F.B.; FERREIRA, G.T.N.M.; SAKAMOTO, S.S. et al. Aspectos radiográficos e densitométricos de fraturas experimentais do rádio de cães tratadas com plasma rico em plaquetas. *Ars Veterinária*, Jaboticabal, SP, v.27, n.1, 001-006, 2011.

VAZ, C.E.S.; GUARNIERO, R.; SANTANA, P.J. Avaliação de concentrado osteogênico de medula óssea na consolidação de fraturas em coelhos. *Acta Ortop. Bras.*, v.18, n.6, p.321-6, 2010.

YÁNEZ, A.; CUADRADO, A, CABRERA, P.J. et al. Experimental analysis of the minimally invasive plate osteosynthesis technique applied with non-locking screws and screw locking elements. *Med. Engin. Physics*, v.36, p. 1543–1548, 2014.

CAPÍTULO 3 - Aplicações percutâneas na ortopedia veterinária

Submetido ao periódico Revista Ciência Rural (Anexo 2)

RESUMO – As aplicações percutâneas consistem na injeção de substâncias ou materiais pela via percutânea com o intuito principal de estimular a cicatrização de tecidos, como ósseo e o tendinoso. Diversos materiais podem ser injetados percutaneamente desde que possuam consistência compatível com o procedimento físico de aplicação. No entanto, o que mais se observa são pesquisas utilizando medula óssea, células-tronco, plasma rico em plaquetas, alguns fármacos e certos biomateriais, na forma líquida ou gel. Dessa forma, o objetivo dessa revisão é investigar os resultados clínicos das aplicações percutâneas na medicina veterinária bem como suas indicações, principais locais de aplicação, descrever enxertos ou outros biomateriais que podem ser utilizadas e suas limitações, baseando-se em evidências clínicas. O plasma rico em plaquetas é mais utilizado para tratar lesões cartilaginosas. Experimentos evidenciam que a aplicação de medula óssea é eficaz para a consolidação óssea, sendo indicada para complicações no tratamento de fraturas. Os polímeros naturais têm sido utilizados como hidrogéis devido a sua excelente biocompatibilidade, mas a maioria dos experimentos ainda é em *in vitro*. As terapias com aplicações percutâneas na medicina veterinária representam uma técnica que tende a crescer, uma vez que se trata de um procedimento minimamente invasivo, sendo necessário que estudos randomizados sejam realizados para garantir sua eficácia.

Palavras-chave: células tronco, hidrogéis, medula óssea, plasma rico em plaquetas, via percutânea.

ABSTRACT - Percutaneous injections of substances or materials have the primary purpose of stimulating healing of tissues such as bone and tendon. Several materials can be injected percutaneously as long as they have the physical consistency compatible with the application process. However, the most commonly observed are researchs regarding the use of bone marrow stem cells, platelet-rich plasma, selected drugs and appropriated biomaterials, in liquid or gel form. Thus, the

objective of this review is to investigate clinical results of percutaneous applications in veterinary medicine as well as the indications and main application sites, to describe grafts or other biomaterials used and their limitations, based on clinical evidence. The platelet rich plasma is the mostly used substance to treat cartilage lesions. Experiments show that the application of bone marrow is effective for bone regeneration, and is adequate for the treatment of fracture complications. Natural polymers such as hydrogels have been used due to its excellent biocompatibility, but most experiments are still in vitro. Percutaneous application in veterinary medicine is a technique with growing tendency, because it requires a minimally invasive procedure, although randomized studies to ensure its effectiveness are required.

Keywords: stem cells, hydrogels, bone marrow, platelet rich plasma, percutaneous application.

Introdução

Importantes avanços têm sido observados no tratamento das fraturas na medicina veterinária, tais como novos implantes e métodos de fixação, que permitem recuperação funcional precoce e mais efetiva do paciente. Métodos como a osteossíntese minimamente invasiva e a técnica “abra, mas não toque” vem sendo cada vez mais utilizados com o objetivo de interferir menos no hematoma inicial da fratura e, com isso, permitindo que ocorra um processo de consolidação mais rápido e efetivo. Apesar dessa evolução nas pesquisas, ainda não existe um meio eficaz e livre de complicações para melhorar ou acelerar o tratamento de uma fratura (VAZ et al., 2010).

Existem variadas opções de biomateriais e enxertos quando se pretende auxiliar no manejo de uma lesão musculoesquelética e, cada uma delas apresenta uma função e forma diferente de aplicação. As aplicações percutâneas tanto de enxertos autólogos de sangue como de biomateriais têm chamado atenção recentemente, pois permitem facilidade de aplicação, representam procedimentos rápidos, que causam menos risco ao paciente, especialmente por serem minimamente invasivos.

Assim, tais aplicações consistem em injetar por via percutânea substâncias ou materiais com o intuito principal de estimular a cicatrização de tecidos, como ósseo e tendinoso (CONNOLLY & SHINDELL, 1986).

Diversos materiais podem ser injetados percutaneamente desde que possuam consistência compatível com a agulha e seringa. No entanto, o que mais se observa são pesquisas utilizando medula óssea (HERNIGOU et al., 2005; GARNAVOS et al., 2010), células-tronco (HERNIGOU et al., 2006), plasma rico em plaquetas (FINNOFF et al., 2011), alguns fármacos (SILVA & GRILLO, 2011) e biomateriais na forma líquida ou gel.

A principal indicação de uso dos biomateriais é em casos de não união óssea, sendo considerado método efetivo e seguro quando se injeta o concentrado osteogênico de medula óssea (HERNIGOU et al., 2005). Mas também podem ser utilizados nos casos de uniões tardias (KASSEM, 2013), osteotomias (D'ELIA et al., 2009), necrose asséptica da cabeça femoral e pseudoartroses (BASTOS FILHO et al., 2012). Dessa forma, o objetivo dessa revisão é investigar os resultados clínicos das aplicações percutâneas na medicina veterinária bem como suas indicações, principais locais de aplicação, descrever enxertos ou outros biomateriais que podem ser utilizadas e suas limitações, baseando-se em evidências clínicas.

Enxertos e biomateriais

O enxerto ósseo autólogo é considerado a técnica “ouro” para se estimular a consolidação óssea (VAZ et al., 2010), sendo a quantidade de enxerto disponível uma das principais complicações, pois dependendo do paciente ela é limitada, não suprimindo a necessidade do sítio receptor. Além disso, existem outras desvantagens do seu uso como danos ao local doador, dor, hematomas, infecção e claudicação. Como alternativa, a aplicação percutânea de aspirados de medula óssea tem sido alvo de pesquisas clínicas e experimentais, buscando-se estimular a consolidação de fraturas (VAZ et al., 2010), tratar pseudoartroses (BASTOS FILHO et al., 2012) e preencher defeitos ósseos adquiridos por trauma ou ressecções ósseas cirúrgicas (D'ELIA et al., 2009; GARNAVOS et al., 2010).

Uma das primeiras experiências clínica com injeção percutânea de aspirado de medula óssea para se auxiliar no tratamento de fraturas foi realizada em 1986 por

CONNOLLY & SHINDELL (1986). Eles administraram em humanos com pseudoartrose, obtendo-se consolidação óssea em seis meses.

BASTOS FILHO et al. (2012) estudaram a segurança e a eficácia da infusão percutânea do aspirado de medula óssea total e da infusão de células mononucleares no foco de pseudoartrose e concluíram que ambas as técnicas foram eficientes, ocorrendo consolidação em todos os casos estudados.

Apesar dos resultados animadores encontrados na literatura, algumas complicações adicionais são possíveis. A presença de material gorduroso e o volume aplicado podem predispor a ocorrência de embolia pulmonar (BASTOS FILHO et al., 2012). Em cães e gatos, essa complicação se torna improvável, uma vez que normalmente o volume administrado não excede a 5 ml, até porque o peso corpóreo do animal muitas vezes não permite extração de grande quantidade de medula óssea. Enquanto que na medicina humana, relatam-se administração de até 100 ml de aspirado medular (BASTOS FILHO et al., 2012).

Outra complicação consiste na formação ectópica de osso se a aplicação da medula óssea ocorrer fora do foco fraturado, como por exemplo no tecido muscular, o qual foi observado por BARROS et al. (2001) em um dos coelhos do seu estudo.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma (MARX, 2004), sendo fonte rica de fatores de crescimento (LIEBERMAN et al., 2002), que favorecem a reparação óssea e a vascularização local, uma das principais características para integração de enxertos ósseos (AGHALOO et al., 2002). Além disso, pode ser facilmente injetado por via percutânea.

Quando se injeta o PRP em uma cirurgia para correção óssea, as plaquetas liberam primeiramente dois fatores de crescimento, dentre outros vários: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador β (TGF- β). No processo de reparação tecidual, o primeiro fator citado se une as células endoteliais dando início a angiogênese, e o segundo se liga aos osteoblastos, fazendo a mitose celular e estimulando a produção de matriz osteóide (TISCHLER, 2001). Dessa forma, o plasma rico em plaquetas está relacionado a uma série de eventos de caráter regenerativo, o que lhe confere a possibilidades de utilização em vários tecidos, especialmente no osso.

Assim, vários estudos são encontrados na literatura com o uso de PRP em fraturas (SILVEIRA, 2009; SOUZA et al., 2011; FILGUEIRA et al., 2014), uma vez que ele possui proteínas osteocondutoras que servem de matriz para a migração epitelial, formação óssea, tornando o PRP uma substância com grande potencial para auxiliar na integração de enxertos (MARX, 2004). Em lesões tendíneas (FINNOFF et al., 2011), o PRP age estimulando a cicatrização, sendo tratamento promissor (LINS et al., 2014). Ainda pode ser associado com injeção de corticosteroides (PEERBOOMS et al., 2010; GOSENS et al., 2011; THANASAS et al., 2011) e utilizado como terapia pós-cirúrgica no tratamento da ruptura do ligamento cruzado cranial em cães (SILVA et al., 2012). Porém, por via percutânea são poucos os trabalhos encontrados na medicina veterinária, ao passo que na medicina humana, a injeção percutânea de PRP como tratamento de lesões musculoesqueléticas se tornou procedimento comumente realizado (LINS et al., 2014).

Da mesma forma que existe risco da aplicação percutânea de medula óssea, também existe risco quando se aplica o PRP, incluindo sangramento, danos neurológicos ou vasculares durante a punção, infecção, sendo a reação alérgica o principal, pois ela pode ocorrer devido à ativação plaquetária com trombina bovina que é o utilizado mais comumente, risco que pode ser eliminado se utilizar cloreto de cálcio ou trombina endógena (WEBB, 2012).

Os biomateriais são substâncias desenvolvidas com o propósito de tratar, aumentar ou substituir de forma parcial ou total diversas partes do organismo, sendo formados por um ou mais de um material (PERRI DE CARVALHO et al., 2002; GIL & FERREIRA, 2006). Também podem ser encontrados na literatura como enxertos aloplásticos e subdivididos conforme origem (natural ou sintética) e sua composição química (metálicos, cerâmicas, polímeros ou compósitos) (DRURY & MOONEY, 2003). Dependendo do biomaterial e da estrutura química, ele pode variar quanto à sua ação mecânica e configuração espacial (blocos sólidos, lâminas, esponjas porosas e hidrogéis) (ABUKAWA et al., 2006).

Normalmente, o que se encontra com relação aos biomateriais que possuem função osteocondutora ou osteoindutora, são formas que substituem o osso e que para serem aplicados necessitam de procedimento cirúrgico para exposição da lesão óssea, ligamentar ou tendínea. Assim, o material a ser utilizado em um determinado

organismo vivo deve apresentar características mecânicas compatíveis com o tecido e localização do implante, considerando suas propriedades físicas (mecânica, formação e degradação do gel), de transporte de massa (difusão) e biológicas (adesão e sinalização celular) (KRETLOW et al., 2009).

Os polímeros naturais têm sido amplamente utilizados como hidrogéis na engenharia de tecidos, devido a sua excelente biocompatibilidade e por possuírem propriedades químicas e físicas adequadas a essa forma (TAN & MARRA, 2010). Dessa forma, uma variedade de hidrogéis, sistemas poliméricos de origem sintética ou natural, altamente hidratados e degradáveis têm sido empregados como *scaffolds* (arcabouços) injetáveis, por apresentarem propriedades estruturais e mecânicas similares à matriz extracelular da maioria dos tecidos (NADERI et al., 2011). Os naturais incluem o colágeno, ácido hialurônico, fibrinogênio, glicosaminoglicanas e quitosana (TAN & MARRA, 2010). Entre os sintéticos estão o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), copolímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), entre outros (DRURY & MOONEY, 2003).

As vantagens da aplicação injetável de biomateriais consistem em menor morbidade ao paciente, devido não ser necessário procedimento cirúrgico para sua utilização, fácil incorporação de vários agentes terapêuticos se o material tiver como função carrear algum fármaco, não conter solventes residuais, que poderão estar presentes nos *scaffolds* pré-formados (NADERI et al., 2011). Outro fator favorável ao uso destes materiais seria a fácil incorporação de agentes ativos solúveis durante a mistura dos polímeros antes da injeção do material, podendo facilmente solucionar problemas de adesão e proliferação celular (PAYNEA et al., 2002), quando associados a células mononucleares da medula óssea.

Uma das principais indicações da aplicação de biomateriais injetáveis inclui correções plásticas na medicina, tais como uso do colágeno bovino para correção do envelhecimento facial (PAULA, 2014) e ácido hialurônico (LEONARDIS et al., 2010). Podem ainda servir para carrear células de transplante para consolidação de tecidos como osso, cartilagem e músculo liso (TAN & MARRA, 2010).

Um estudo realizado por SALGADO (2009) utilizando matrizes um gel de ácido sebácico com policaprolactona injetados na tíbia de ratos, não observou reações

adversas de inflamação ou morte celular e, aos 90 dias observou-se consolidação óssea completa.

O campo da engenharia de tecidos estar cada vez mais avançado, são poucos os trabalhos com aplicações percutâneas na medicina veterinária, visto que muitos desses materiais ainda estão sendo utilizados *in vitro* ou em culturas de células como o realizado por ALHADLAQ et al. (2004), que utilizaram duas camadas de hidrogel formados por polimerização carreando fatores de crescimento condrogênico e osteogênico e aplicaram em cultura de células mesenquimais adultas e observaram osteogênese e condrogênese após quatro semanas de implante. Assim, são necessários mais estudos para que se saiba exatamente a ação desses biomateriais no organismo; mesmo sendo conhecida sua biocompatibilidade são necessários estudos randomizados para que sua eficácia na consolidação óssea possa ser comprovada.

Terapia celular

Apesar de muitas inovações e descobertas na área da engenharia tecidual, a enxertia autóloga continua sendo a técnica mais utilizada pelos médicos nos casos de traumas graves com perdas ósseas, no qual é necessária uma fonte fornecedora de tecido ósseo como, por exemplo, a crista ilíaca e o tubérculo maior do úmero. Entretanto, dependendo da extensão do trauma, a fonte é limitada e a abertura de um novo campo cirúrgico causa mais dor ao paciente e aumenta os índices de morbidade (TAN et al., 2013). Por isso terapias alternativas vêm sendo desenvolvidas dentro da engenharia de tecidos ósseos e uma delas é a utilização de células tronco, que tem por objetivo estimular e reduzir o tempo do processo de consolidação óssea (BENTINI, 2013).

As células tronco (CT), células mãe, células estaminais ou *stem cells* são células que possuem a capacidade de se auto reproduzirem e de gerarem novas células com propriedades específicas de certos tecidos (GROMPE, 2012).

De acordo com o local de origem, as CTs podem ser classificadas em células tronco embrionárias e células tronco adultas ou somáticas (DEL CARLO et al., 2008). As CTs embrionárias são derivadas da massa celular interna do embrião e podem se diferenciar em tipos celulares dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma

e ectoderma) (ILLICH et al., 2011). As CTs adultas são derivadas de órgãos e tecidos adultos, como músculos, tecido adiposo e medula óssea. São chamadas de multipotentes, ou seja, podem originar vários tipos celulares, mas em número limitado. O principal papel de uma célula tronco adulta em um organismo vivo é manter e reparar o tecido no qual se encontram. Possuindo assim, uma característica chamada de plasticidade celular, que confere ampla capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares (MATSUOKA et al., 2006).

As CTs de medula óssea são as mais utilizadas em terapia celular, especialmente pela facilidade de sua obtenção. Além disso, elas apresentam capacidade de se diferenciarem em vários tipos celulares, como osteoblastos e condrócitos, sendo uma boa alternativa para reparo e consolidação tecidual (JAFARIAN et al., 2008).

Vários estudos estão sendo realizados com as células tronco em animais, mas ainda não se sabe ao certo como elas causam a melhora da lesão. Alguns autores citam que isso possa ocorrer devido a liberação de mediadores químicos, tais como citocinas e fatores de crescimento no local da lesão, que estimulam a angiogênese e reduz o número de mortes celulares (MONTEIRO et al., 2010).

Aplicações clínicas

Alguns trabalhos de importância clínica podem ser citados na aplicação percutânea de substâncias, levando em consideração que nem todos possuem uma metodologia randomizada e sim experimental, uma vez que a área engenharia de tecidos para consolidação óssea com materiais injetáveis é relativamente nova.

O plasma rico em plaquetas possui uma série de benefícios para tratar lesões musculoesqueléticas, sendo as lesões cartilaginosas umas das mais pesquisadas recentemente. Assim, YAMADA (2011) realizou um estudo no qual tratou lesões induzidas na cartilagem de equinos com aplicações intra-articulares de PRP e CT mesenquimais, sendo esse benéfico e eficaz no tratamento das lesões condrais. O mesmo autor ainda cita que o gel do PRP forma um arcabouço que permite a implantação de células mesenquimais, orientando sua proliferação organizada.

SAITO et al. (2009) utilizaram coelhos como modelo de ensaio, realizando a ruptura do ligamento cruzado cranial e comparando a injeção intra-articular do PRP

ou do plasma pobre em plaquetas (PPP) ambos contidos em hidrogéis de gelatina. Esse tratamento foi iniciado quatro semanas após a ruptura do ligamento e realizado duas vezes a cada sete dias, durante três semanas. Os autores observaram que houve uma supressão morfológica e histológica na progressão da doença osteoarticular quando se utilizou o PRP comparado com o PPP.

Em trabalho semelhante, mas utilizando um cão proveniente da rotina clínico-cirúrgica veterinária realizado por SILVA et al. (2012), realizaram três injeções intra-articulares de PRP com intervalos de 15 dias como terapia pós-cirúrgica da ruptura do ligamento cruzado cranial, obtendo-se um bom retorno funcional do membro e modulação da osteoartrose, ou seja, comparando as radiografias antes e após o tratamento observou-se mínima progressão dos seus sinais.

MORAES (2013) fez a avaliação clínica, laboratorial e ultrassonográfica de injeções de PRP na articulação metacarpofalangeana de equinos comparando com a aplicação de solução fisiológica. Nos animais que receberam três aplicações com intervalos de sete dias do PRP não foram observadas alterações clínicas e laboratoriais, contudo ao exame ultrassonográfico notou-se um aumento da vascularização da membrana sinovial, sugerindo que o PRP possui uma ação pro-inflamatória leve e provisória que não causa alterações na cartilagem.

Existem diversos trabalhos mostrando a aplicação clínica do PRP, medula óssea, células tronco e outros biomateriais, entretanto trabalhos clínicos relatando sua utilização injetável percutânea são poucos. Na medicina, ocorre o contrário, pois a maioria dos trabalhos cita sua utilização percutânea, principalmente relatos de casos como o de SANCHEZ et al. (2003) que citam o uso de 2 mL PRP ativado com o cloreto de cálcio para tratar avulsão na cartilagem de um atleta no qual obteve-se sucesso, tendo o paciente retornado as suas funções competitivas após 18 semanas. A partir deste, vários trabalhos randomizados podem ser encontrados.

HERNIGOU et al. (2006) realizaram um estudo utilizando a fração concentrada das células mononucleares da medula óssea para tratar não-união óssea na diáfise da tíbia em humanos, aplicada por via percutânea. Observaram reversão da não-união e consolidação óssea em 88% dos casos e o sucesso do tratamento era proporcional à concentração celular.

Um estudo realizado por ZAMPROGNO (2007) relata que a terapia com CTs proveniente da medula óssea, mostrou-se efetiva para a estimulação osteogênica de não união de fraturas em seis animais, por meio da injeção percutânea, promovendo a união óssea nesses pacientes que apresentavam um ano ou mais de fratura.

PACINI et al. (2007) realizaram um estudo com equinos que apresentavam inflamação do tendão do músculo flexor digital superficial, no qual o grupo tratamento com 11 animais recebeu CTs derivadas da medula óssea e o grupo controle recebeu a terapia convencional. Dos 11 equinos tratados com CTs, nove apresentaram melhora significativa quando avaliados pela ultrassonografia, e retornaram à atividade atlética sem recidiva. Enquanto que os animais do grupo controle apresentaram recidiva após sete meses (média) de tratamento.

Mais recentemente, KASSEM (2013) obteve 95% de sucesso no tratamento de fraturas com não-união e união tardia, utilizando o aspirado de medula óssea percutaneamente. Ainda cita que não foi observado infecção ou dor local.

Já os hidrogéis são uma classe de biomateriais que possuem uma boa biocompatibilidade, flexibilidade na sua confecção, composição variável e propriedades físicas que podem se assemelhar ao ambiente fisiológico onde será implantado. Essas características fazem com que eles, isoladamente ou em associação com células tronco, apresentem diversas aplicações na área biomédica (LI et al., 2012). Assim, NADERI-MESHKIN et al. (2014) observaram que o hidrogel de quitosano beta-glicerol-fosfato-hidroxietil-celulose quando injetado em cultura de células tronco mesenquimais propiciou condições adequadas para a diferenciação dessas células em condroblastos, sendo recomendado para utilização na engenharia de tecidos.

MARTINS (2010) estudou a biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao glicerol fosfato, injetando-o em defeitos osteocondrais induzidos na tróclea do *talus* de equinos e observou que o gel de quitosana glicerol fosfato foi biocompatível com a articulação e pode ser utilizado em futuros estudos como suporte de CTs mesenquimais e para liberação controlada de medicamentos.

Jl et al. (2010) avaliaram a mandíbula e maxila de cães após a injeção de hidrogéis com base de quitosana, sendo recomendado para a consolidação de tecidos e como veículo de fármacos.

Em um estudo utilizando CTs mesenquimais de coelhos, PARK et al. (2007) avaliaram a eficácia de um hidrogel injetável (polietileno glicol fumarato) no carregamento de fatores de crescimento para consolidação de cartilagem. Os resultados desse experimento sugerem que o hidrogel foi um biomaterial promissor para ser injetado no meio de cultivo células, favorecendo a diferenciação destas em condrócitos e sendo viável para carrear substâncias bioativas.

Conclusão

As terapias com aplicações percutâneas na medicina veterinária representam técnicas que tendem a crescer, uma vez que se trata de um procedimento minimamente invasivo, evitando com que os animais sejam submetidos a um novo procedimento cirúrgico.

Experimentos evidenciam que a aplicação de medula óssea tanto concentrada como em sua fração total é eficaz para a consolidação óssea, sendo indicada principalmente nos casos de não-união ou atrasos na união óssea. Enquanto que o PRP apresenta estudos controversos, uma vez que sua concentração influencia diretamente para uma melhora ou piora na cicatrização.

Os biomateriais na forma de hidrogéis e as células-tronco já estão sendo utilizados há muitos anos, mas a maioria dos experimentos ainda é em *in vitro*, sendo necessário que estudos randomizados sejam realizados para garantir sua eficácia.

Agradecimentos

À Fapesp pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio à pesquisa.

Referências

- ABUKAWA, H. et al. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. **Dental Clinics of North America**, v.50, p.205-216, 2006.
- AGHALOO, T.I. et al. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.60, n.10, p.1176-1181, 2002.
- ALHADLAQ, A. et al. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle. **Annals of Biomedical Engineering**, v.32, p.911, 2004.

- BARROS, S.V.S.G. et al. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em coelhos. II. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, v.23, p.1013-1018, 2001.
- BASTOS FILHO, R. et al. Terapia celular da pseudoartrose. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.20, n.5, p.270-3, 2012.
- BENTINI, R. **Produção de suportes poliméricos para o crescimento das células-tronco mesenquimais e sua aplicação em consolidação óssea**. 2013. 146f. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- CONNOLLY, J.; SHINDELL, R. Percutaneous marrow injection for no ununited tibia. **The Nebraska Medical Journal**, v.71, p.105-107, 1986.
- D'ELIA, C.O. et al. O uso do plasma rico em plaquetas associado ao aspirado de medular óssea na osteotomia tibial tipo Puddu. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.44, n.6, p.508-12, 2009.
- DEL CARLO, R.J. et al. Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, supl1, p.167-169, 2008.
- DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, p. 4337–4351, 2003.
- FILGUEIRA, F.G.F. et al. Platelet rich plasma and bone marrow in minimally invasive osteosynthesis in the tibia of dogs. Preliminary results. **Veterinary and Comparative Orthopaedics Traumatology**, v.4, suppl., A27, 2014.
- FINNOFF, J.T. et al. Treatment of chronic tendinopathy with ultrasound-guided needle tenotomy and platelet-rich plasma injection. **PM R**, v.3, n.10, p.900-11, 2011.
- GARNAVOS, C. et al. Fixed intramedullary nailing and percutaneous autologous concentrated bone marrow grafting can promote bone healing in humeral-shaft fractures with delayed union. **Injury**, v.41, p.563-567, 2010.
- GIL, M.H; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. **Química**, v.100, p.72-74, 2006.
- GOSENS, T. et al. Ongoing positive effect of platelet-rich plasma versus corticosteroid injection in lateral epicondylitis: a double-blind randomized controlled trial with 2-year follow-up. **American Journal of Sports Medicine**, v.39, 1200-1208, 2011.

- GROMPE, M. Tissue stem cells: new tools and functional diversity. **Cell Stem Cell**, v.10, n.6, p.685-689, 2012.
- HERNIGOU P. et al. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.87, p.896-902, 2005.
- HERNIGOU, P. et al. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. surgical technique. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.88, p.322-327, 2006. doi:10.2106/JBJS.F.00203
- ILLICH, D.J. et al. Concise review: induced pluripotent stem cells and lineage reprogramming: prospects for bone regeneration. **Stem Cells**, v.29, n.4, p.555-563, 2011.
- JAFARIAN et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. **Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 105, n. 5, p. e14-24, 2008.
- Jl, Q.X. et al. Biocompatibility of a chitosan-based injectable thermosensitive hydrogel and its effects on dog periodontal tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p.1153–1160, 2010.
- KASSEM, M.S. Percutaneous autogenous bone marrow injection for delayed union or non union of fractures after internal fixation. **Acta Orthopaedica Belgica**, v.79, p.711-717, 2013.
- KRETLOW, J. D. et al. Injectable biomaterials for regenerating complex craniofacial tissues. **Advanced materials**, v.21, p.32-33, 2009. doi:10.1002/adma.200802009.
- LEONARDIS, M. et al. Use of crosslinked carboxymethyl cellulose. **Clinical Interventions in Aging**, v.5, p.317-322, 2010. doi: 10.2147/CIA.S13813.
- LI, Y. et al. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v.41, p.2193–2221, 2012.
- LIEBERMAN, J.R. et al. The hole of growth factors in repair bone. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.84(A), n.6, p.1032-1042, 2002.
- LINS, C.F. et al. A aplicação de plasma rico em plaquetas (prp) em lesões musculoesqueléticas – revisão de literatura. **News: Artigos Cetrus**, v.57, p.1-16, 2014.

MARTINS, E. A. N. **Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao glicerol fosfato para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do *talus* de eqüinos**. 2010. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Curso de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, n.62, p.489–496, 2004.

MATSUOKA, A.J. et al. In vivo and in vitro characterization of bone marrow-derived stem cells in the cochlea. **Laryngoscope**, v.116, p.1363-1367, 2006.

MONTEIRO, B.S. et al. Células tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v.40, n.1, 2010.

MORAES, A. P. L. **Resposta ao uso intra-articular do plasma rico em plaquetas em equinos hígidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos**. 2013. 131f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

NADERI, H. et al. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 26, p. 383-419, 2011.

NADERI-MESHKIN, H. et al. Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering., v.38, n.1, p.72-84, 2014. doi: 10.1002/cbin.10181.

PACINI, S. et al. Suspension of bone marrow-derived undifferentiae mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. **Tissue Engineering**, v.12, p.2949-55, 2007.

PARK, H. et al. Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v.28, p.3217–3227, 2007.

PAULA, M. **Biomateriais injetáveis de colágeno bovino para correções plásticas em geral**. Acessado em 22 dez. 2014. Online. Disponível em: http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/21082007/biomateriais.asp .

PAYNEA, R.G. et al. Development of an injectable, in situ crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations. Part 1.Encapsulation of marrow

stromal osteoblasts in surface crosslinked gelatin microparticles. **Biomaterials**, v.23, p.4359–4371, 2002.

PEERBOOMS, J.C. et al. Positive effect of an autologous platelet concentrate in lateral epicondylitis in a double-blind randomized controlled trial: platelet-rich plasma versus corticosteroid injection with a 1-year follow-up. **The American Journal of Sports Medicine**, v.38, p.255-262, 2010.

PERRI DE CARVALHO, P.S. et al. Biomateriais utilizados em implantodontia. In: GOMES, L.A. **Implantes Osseointegrados: técnica e arte**. São Paulo: Ed. Santos, 2002. Cap.3, p.77-92.

SAITO, M. et al. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.2, p.201-207, 2009.

SALGADO, C.L. **Desenvolvimento de matrizes tridimensionais poliméricas para aplicação em engenharia de tecido ósseo**. 2009. 164f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas.

SANCHEZ, M. et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: A case report. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.10, p.1648-1652, 2003.

SILVA, R.F. et al. Uso de plasma rico em plaquetas intra-articulares como tratamento pós-cirúrgico da ruptura do ligamento cruzado cranial num cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.4, p.847-852, 2012.

SILVA, Y.S.; GRILLO, R. Injeções intra-articulares de corticosteróides versus hialuronato de sódio para tratamento de desarranjos internos da articulação temporomandibular. **Odonto**, v.19, n.38, p.105-114, 2011.

SILVEIRA, P. R. **Utilização de plasma rico ou pobre em plaquetas, associado ou não à enxerto ósseo cortical alógeno, na reparação cirúrgica de falha ulnar em ovinos**. 2009. 83p. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Curso de pós-graduação em Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

- SOUZA, T.F.B. et al. Aspectos radiográficos e densitométricos de fraturas experimentais do rádio de cães tratadas com plasma rico em plaquetas. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.27, n.1, 001-006, 2011.
- TAN, H.; MARRA, K.G. Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. **Materials**, v.3, p.1746-1767, 2010. doi:10.3390/ma3031746.
- TAN, L.Y.X. et al. Biodegradable materials for bone repair: a review. **Journal Material Science and Technology**, v.29, n.6, p.503-513, 2013.
- THANASAS, C. et al. Platelet-rich plasma versus autologous whole blood for the treatment of chronic lateral elbow epicondylitis: a randomized controlled clinical Trial. **The American Journal of Sports Medicine**, v.39, p.2130- 2134, 2011.
- TISCHLER, M. Platelet rich plasma: the use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. **The New York State Dental Journal**, v.68, n.3, p.22-24, 2001.
- VAZ, C.E.S. et al. Avaliação de concentrado osteogênico de medula óssea na consolidação de fraturas em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.18, n.6, p.321-326, 2010.
- WEBB, C.A. Platelet-Rich Plasma Update: Clinical Use in Musculoskeletal Care. **Journal of Musculoskeletal Medicine**, v.29, p.96-101, 2012.
- YAMADA, A.L.M. **Efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas (PRP) e células tronco mesenquimais na reparação de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos**. 2011. 145f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de pós-graduação em medicina veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- ZAMPROGNO, H. Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35(Supl 2), p.289-290, 2007.

CAPÍTULO 4 - Considerações finais

- Limitações do estudo

A principal limitação do estudo foi a falta de compromisso por parte de alguns proprietários, tendo que muitas vezes excluir o paciente do grupo experimental e aguardar que outro animal em condições de inclusão na pesquisa aparecesse na rotina clínico-cirúrgica do Hospital Veterinário, impossibilitando assim, a obtenção de um número maior de pacientes.

Outra limitação se deve à falta de padronização com relação à idade, raça, sexo, peso e tipo de fratura nos animais, uma vez que depende da rotina dos casos que chegam ao Hospital Veterinário, variando os resultados e o tempo de realização do projeto. Além disso, o tipo de fratura influencia, uma vez que, fraturas cominutivas permitem maior aplicabilidade da técnica da osteossíntese minimamente invasiva enquanto as oblíquas são menos recomendadas.

- Conclusões

Os biomateriais plasma rico em plaquetas, medula óssea e quitosana contribuem na consolidação óssea associados à osteossíntese minimamente invasiva na tíbia de cães;

O concentrado de medula óssea promove menor tempo de consolidação óssea quando comparado aos grupos controle, plasma rico em plaquetas e quitosana;

Os escores radiográficos são essenciais para determinar o tempo de união clínica e consolidação da fratura, principalmente a escala de avaliação radiográfica;

Não há diferença estatística na avaliação clínica e na densidade mineral do calo ósseo formado entre os grupos;

A técnica da MIPO pode ser realizada adequadamente mesmo sem utilizar intensificadores de imagem;

A quitosana não causa reação inflamatória ou complicações indesejáveis.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 017930/12 do trabalho de pesquisa intitulado **"Plasma rico em plaquetas, medula óssea e quitosana nas osteossínteses minimamente invasivas da tíbia de cães"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 04 de setembro de 2012.

Jaboticabal, 04 de setembro de 2012.

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

APÊNDICE B: Metodologia detalhada

1. Resumo da metodologia

1.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos realizados foram previamente submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Câmpus de Jaboticabal, e aprovado de acordo com os preceitos éticos estabelecidos para os animais de experimentação com o número de protocolo 017930/12 (Apêndice A).

1.2 Protocolo experimental

1.2.1 Animais e ambiente de experimentação

O presente projeto foi desenvolvido, na sua totalidade, no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Jaboticabal - SP.

Foram estudados 30 animais da espécie canina (*Canis familiaris*) apresentando fratura da tíbia provenientes da rotina clínico-cirúrgica do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário supracitado no período de fevereiro de 2012 a maio de 2015. As fraturas encontradas foram classificadas de acordo com a AO/ASIF (PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009).

Foram realizados exames radiográficos pré-operatórios, bem como exames de hemograma, leucograma, plaquetograma e bioquímico de rotina (creatinina e alanina aminotransferase).

Os proprietários de todos os cães inclusos no experimento assinaram um termo de compromisso permitindo o acompanhamento pós-cirúrgico dos animais e se comprometendo durante o período experimental a fazer todos os retornos necessários (Apêndice C).

1.2.2 Critérios de inclusão

Foram considerados candidatos em potencial, aqueles cães jovens ou adultos que apresentaram fratura da tíbia, associada ou não a fratura da fíbula, em especial fraturas cominutivas ou com mais de um segmento fraturado, com até dez dias após o trauma.

Os animais que apresentaram sinais evidentes de desnutrição (escore corporal baixo, desidratação, anorexia, apatia), ou outra afecção sistêmica que pudesse comprometer a consolidação óssea como disfunções renais, cardíacas e hormonais, além de fraturas expostas de qualquer grau foram excluídos da presente pesquisa.

1.2.3 Implantes

Foram utilizadas placas retas de aço inoxidável¹, com sistema de bloqueio dos parafusos, disponíveis nos sistemas 2, 2.7, 3.5 e 4.5 mm, sendo o tamanho escolhido conforme o peso corporal e estrutura óssea do paciente.

Os parafusos corticais bloqueados² de aço inoxidável, disponíveis nos sistemas 2, 2.7 e 3.5 mm, foram utilizados de acordo com a numeração da placa e com medições realizadas durante o procedimento cirúrgico com auxílio de instrumento medidor de profundidade. Esses implantes estão disponíveis comercialmente.

1.2.4 Grupos experimentais

Foram criados quatro grupos experimentais aleatoriamente, cada um composto por oito animais, exceto o grupo 4 com seis, sendo eles:

Grupo 1 – representado pelos animais nos quais foram realizadas as osteossínteses minimamente invasivas com placa bloqueada e nada foi injetado no foco da fratura, sendo este o grupo controle;

¹ Placa reta com bloqueio – Cãomédica- Campinas, SP, Brasil.

² Parafuso de bloqueio – Cãomédica – Campinas, SP, Brasil.

Os demais grupos foram constituídos por animais submetidos as osteossínteses minimamente invasivas com placa bloqueada e aplicação de um biomaterial diferente, sendo eles:

Grupo 2 – injeção do concentrado de medula óssea;

Grupo 3 – injeção de plasma rico em plaquetas;

Grupo 4 – injeção do gel de quitosana.

1.2.5 Preparo pré-operatório e anestésico

Todos os pacientes receberam medicação pré-anestésica (MPA) por meio da aplicação intramuscular de cloridrato de clorpromazina³ (0,3 mg/kg) e Morfina⁴ (0,25 mg/kg). Aguardou-se 20 minutos e com o paciente já sob efeito da MPA, foi realizada a venóclise com cateter⁵ de tamanho adequado a cada paciente. Após tricotomia ampla do membro fraturado e região lombo-sacra, os pacientes foram encaminhados imediatamente ao centro cirúrgico. Ato contínuo, foi realizada indução anestésica com o agente Propofol⁶ (4 mg/kg IV), intubação orotraqueal com sonda e manutenção da anestesia com uma mistura de isoflurano e oxigênio a 100%. Em seguida, o animal foi posicionado em decúbito ventral com os membros pélvicos estendidos cranialmente para realização de antissepsia com clorexidine⁷ e álcool⁸ respectivamente, seguido da anestesia local epidural utilizando-se agulha de Tuohy⁹ para deposição dos agentes lidocaína¹⁰ sem vasoconstritor 2% (4 mg/kg) associada à bupivacaína¹¹ 0,75% sem vasoconstritor (2 mg/kg) e cloridrato de tramadol¹² (0,5 mg/kg) no espaço entre sétima vértebra lombar e primeira vértebra sacral (L7-S1).

³ Longactil 25 mg/ml- Cristália, Produtos Químicos Farmacet. Ltda, Itapira/SP.

⁴ Dimorf 10 mg/ml - Cristália, Produtos Químicos Farmacet. Ltda, Itapira/SP.

⁵ Cateter 22 BD Angiocath, USA.

⁶ Profol 1% - Cristália, Produtos Químicos Farmacet. Ltda, Itapira/SP.

⁷ Rioex 2% - Rioquímica Indústria Farmacêutica – São José do Rio Preto/SP.

⁸ Rialcool 70 - Rioquímica Indústria Farmacêutica – São José do Rio Preto/SP.

⁹ Agulha Tuohy Epidural – 16Gx, Imp. Cirúrgica Fernandes Ltda, UNISIS Corp. Tokyo, Japan.

¹⁰ Xylocaína 2% – Hipolabor Farmacêutica Ltda, Sabará/MG.

¹¹ Neocaína 0,75%- Cristália - Produtos Químicos Farmacet. Ltda, Itapira/SP.

¹² Tramal 5% – Hipolabor Farmacêutica Ltda, Sabará/MG.

1.2.6 Preparação da medula óssea (MO)

Após antissepsia ampla e colocação de panos de campo, os animais anestesiados foram colocados em decúbito lateral e submetidos à colheita de MO. As amostras foram obtidas por punção rotacional e aspiração com o auxílio de agulha 40x16¹³. O local de punção foi o tubérculo maior do úmero contralateral ao membro pélvico fraturado, facilitando o posicionamento na mesa cirúrgica. A colheita foi realizada com seringas de 20 mL¹⁴ previamente heparinizadas com Liquemine¹⁵.

Foram colhidos 10 mL de medula óssea. A amostra foi colocada em tubo e levada ao Laboratório de Pesquisas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP - Jaboticabal, no qual foi processada em uma Centrífuga¹⁶ a 1500 rotações por minuto durante 10 minutos, para concentrar as células tronco mesenquimais, conforme citado por Del Carlo et al. (2004). Ainda foi retirada uma quantidade de 0,5 mL para contagem da porcentagem de células nucleadas.

Após a centrifugação, o plasma sobrenadante foi descartado utilizando-se uma capela de fluxo laminar¹⁷ e o concentrado medular levado ao centro cirúrgico para utilização na osteossíntese. Enquanto isso, as amostras de 0,5 mL de MO e 0,5 mL do concentrado de MO foram, previamente, colocadas em microtubos identificados e levadas ao laboratório para diluição em solução de Turk¹⁸.

Em microscopia de luz óptica¹⁹, foram contados os quatro quadrantes laterais da câmara de Neubauer e depois somados. Esse valor era multiplicado por 102,5 para as amostras antes da centrifugação e por 2050 para as amostras após a centrifugação.

1.2.7 Preparação do plasma rico em plaquetas

O protocolo para preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) seguiu a metodologia descrita por Aleixo et al. (2011).

¹³ Agulha 40x16mm –Becton Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda, Curitiba/PR.

¹⁴ Seringa 20 mL –Becton Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda, Curitiba, PR.

¹⁵ Liquemine – Heparina sódica, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, RJ.

¹⁶ Centrífuga Baby I Centrifuge Mod. 206, Fanem, São Paulo, Brasil.

¹⁷ Capela de Fluxo Laminar VECO, modelo: Bioprotector-12.

¹⁸ Líquido de Turk - Renylab Química e Farmacêutica Ltda, Barbacena – MG.

¹⁹ Microscópio Nikon Eclipse E200.

A coleta de sangue foi realizada antes da aplicação da MPA, com agulha calibre 25x7mm²⁰. Foi colhido, de cada paciente, um frasco de sangue de 4,5 mL contendo citrato de sódio²¹ e foram levados para o Laboratório de Pesquisas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP de Jaboticabal.

Para obtenção do PRP, as amostras coletadas passaram por duas centrifugações. A primeira centrifugação a 1200 RPM por 10 minutos, no qual todo o plasma e a zona de névoa foram aspirados, transferidos para um tubo estéril sem aditivo e concentrados pela segunda vez, agora a 1600 RPM por 10 minutos. Em seguida, descartou-se aproximadamente 80% do sobrenadante com um pipetador automático²², permanecendo apenas a parte mais concentrada em plaquetas e o botão plaquetário que se encontrava no fundo do tubo. Depois realizou-se a plaquetometria do plasma contido nos tubos pelo Analisador Hematológico Veterinário²³ para verificar a contagem final das plaquetas. Foram contadas no microscópio óptico (no aumento de 400x) as plaquetas encontradas dentro dos 25 quadrantes centrais de cada lado da câmara de Neubauer²⁴, e esse valor foi multiplicado por 1000 para fornecer a quantidade de plaquetas total por μ L.

Para ativação plaquetária, os tubos foram levemente agitados e foi adicionado cloreto de cálcio²⁵ 2:1 (1 mL de PRP para 0,5 mL do ativador de plaquetas), que passou a apresentar consistência gelatinosa (gel de plaquetas).

1.2.8 Preparação do gel de quitosana

O hidrogel de quitosana foi preparado e esterilizado em sua totalidade pela equipe da Profa. Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos, na Universidade Federal de Alfenas em Alfenas, Minas Gerais.

O gel foi obtido de acordo com o procedimento proposto por Chenite et al. (2000). Para tanto, 200 mg de quitosana (com alto peso molecular e grau de desacetilação superior a 75% (Sigma-Aldrich, CAS Number: 9012-76-4) foram

²⁰ Agulha de coleta múltipla preta – Vacuette do Brasil - Americana/SP.

²¹ Tubos de coleta a vácuo com citrato de sódio a 3,2% – Labor Import - Osasco/SP.

²² Micropipeta automática 20-200 μ L Eppendorf Research – Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo/SP.

²³ Analisador Hematológico Veterinário POCH-100i Diff, Sysmex

²⁴ Câmara de Neubauer dupla espelhada – In Lab – Brand Germany.

²⁵ Cloreto de cálcio 10% - Injectcenter, Ribeirão Preto/SP.

dissolvidos em 9 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 M. À solução resultante, foram adicionados, lentamente e sob agitação, 560 mg de fosfato de glicerol dissódico (Glycerol phosphate disodium salt hydrate – Sigma-Aldrich, CAS Number: 55073-41-1), previamente dissolvidos em 1 mL de água destilada, o que levou à formação de gel esbranquiçado. Após o preparo, o gel foi submetido à esterilização em autoclave e conservação à temperatura ambiente média de 25°C, para posterior aplicação de 2 mL no foco da fratura (Figura 1).

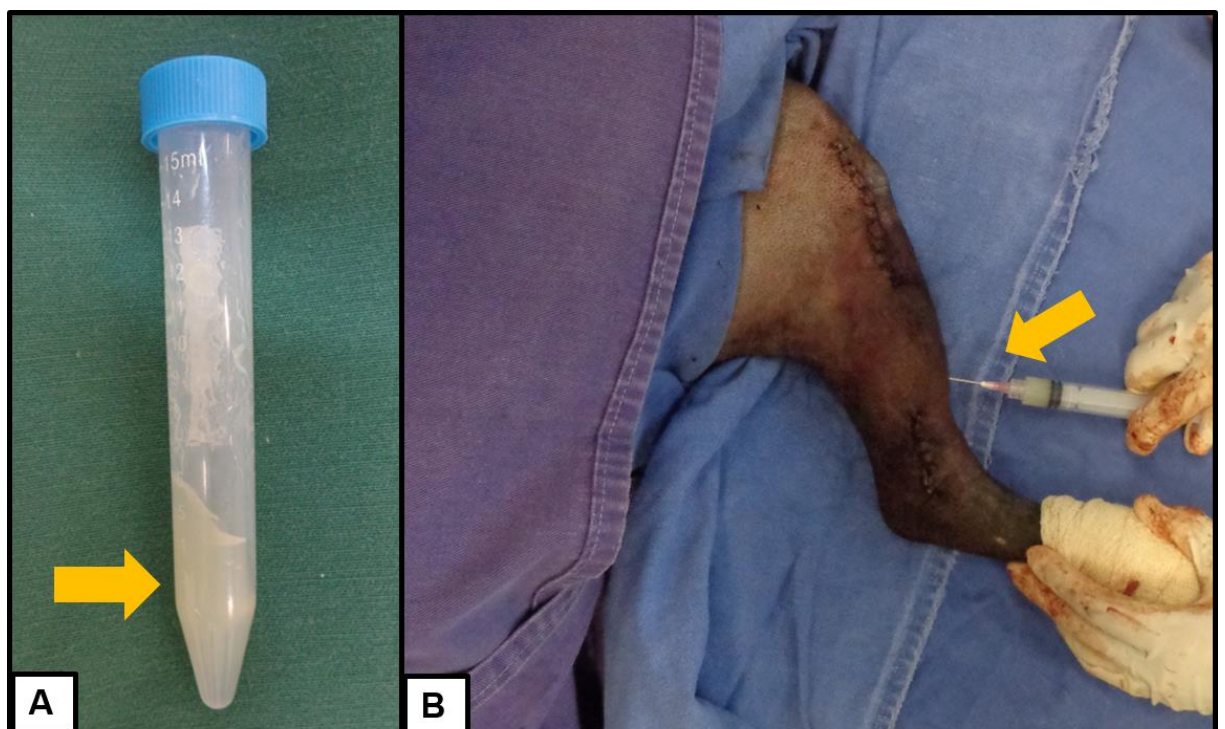


Figura 1. A. Imagem fotográfica de um tubo do tipo falcon contendo o hidrogel de quitosana (seta). **B.** Hidrogel de quitosana (seta) sendo aplicado no foco da fratura após o procedimento de osteossíntese minimamente invasiva com placa em um animal do grupo 4 (quitosana), Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP. Jaboticabal, SP - 2015.

1.2.9 Procedimento cirúrgico

Com o paciente em decúbito dorsal, foi realizada antissepsia com clorexidina 2% seguida por álcool. Foram aplicados panos cirúrgicos de tecido, e a extremidade do membro foi protegida por malha tubular estéril²⁶.

A fratura foi reduzida de maneira fechada e indireta, com o mínimo de manipulação. O alinhamento e comprimento ósseo foram atingidos com base nas referências anatômicas do próprio membro e comparação com o membro contralateral, sem uso de intensificadores de imagem.

O acesso cirúrgico foi restrito a duas pequenas incisões na face medial da tíbia (Figura 2), sendo uma proximal e uma distal ao foco de fratura. Nessas regiões foi realizado divulsão do tecido subcutâneo e afastamento da musculatura até atingir a superfície óssea. A placa foi inserida através da incisão proximal e então deslizada pelo túnel de tecidos moles adjacentes à superfície do osso, sobre o local da fratura. Após o adequado posicionamento da placa sobre a superfície óssea, foram realizados os orifícios para a aplicação dos parafusos bloqueados, com o auxílio de um guia de perfuração e uma broca longa. A placa foi moldada em alguns pacientes, com o cuidado de preencher os furos bloqueados com parafusos, para evitar que fossem danificados e que posteriormente não fosse possível bloquear os parafusos na região moldada da placa. Os parafusos corticais bloqueados foram inseridos no tecido ósseo através das incisões que foram feitas para inserção da placa. A quantidade necessária de parafusos a ser colocada foi definida de acordo com cada fratura. Após a colocação dos parafusos, a ferida cirúrgica foi suturada em três camadas, sendo o utilizado o fio poliglecaprone 2-0 para a sutura de musculatura e redução do espaço morto (subcutâneo) com o padrão simples contínuo em ambas, e o fio de náilon 3-0 foi utilizado para o padrão simples separado na sutura de pele.

²⁶ Malha tubular estéril – Polarfix, Polar Medical Ind. e Comércio de Products Hospitalares Ltda, Mauá/SP.

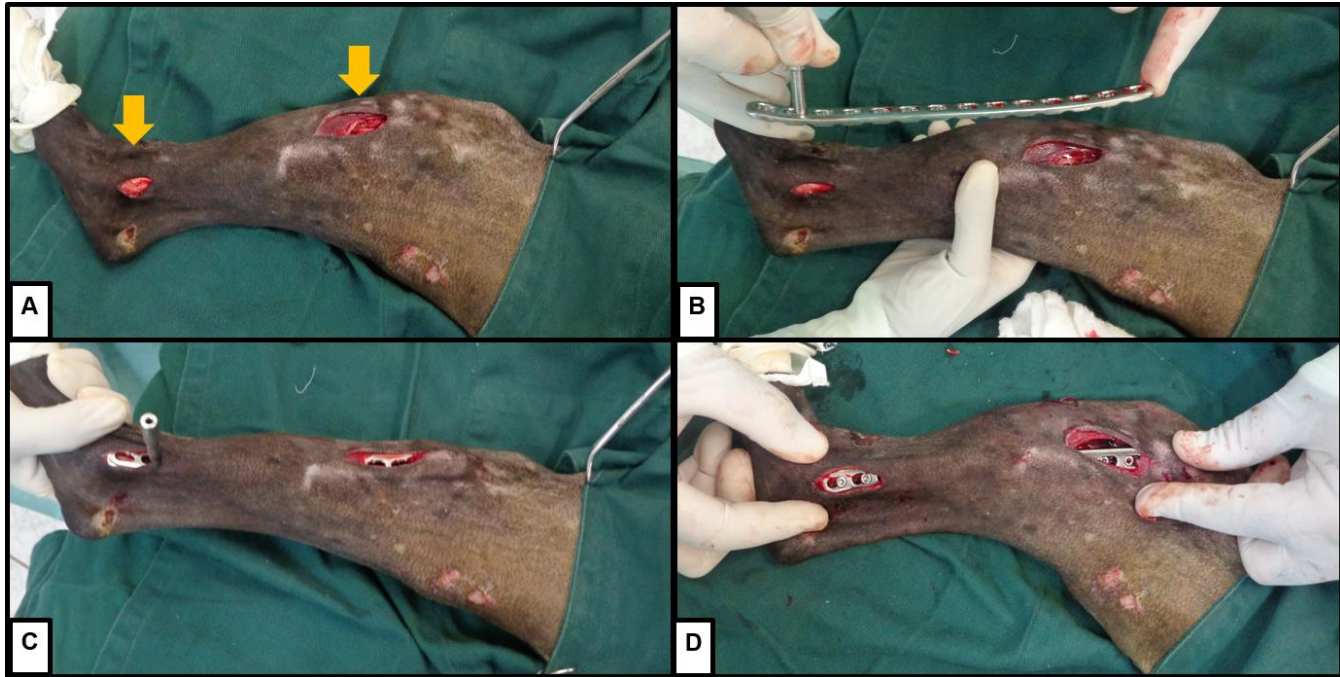


Figura 2. **A.** Imagem fotográfica da sequência da osteossíntese minimamente invasiva com placa na tíbia. Incisões proximais e distais (setas amarelas) ao foco da fratura. **B.** Verificação do tamanho da placa a ser utilizada no membro. **C.** Introdução da placa pelo túnel de tecidos moles adjacentes à superfície do osso, sobre o local da fratura. **D.** Inserção dos parafusos na placa óssea. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP. Jaboticabal, SP - 2015.

Após a sutura de pele, colocou-se uma agulha calibre 40x12mm²⁷ por via percutânea através de palpação dentro da falha óssea no foco da fratura, e de acordo com o grupo de cada animal, foi injetado de uma só vez 2 mL de cada biomaterial (Figura 3). No grupo controle, nada foi injetado.

²⁷ Agulha 40x12mm –Becton Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda, Curitiba/PR.

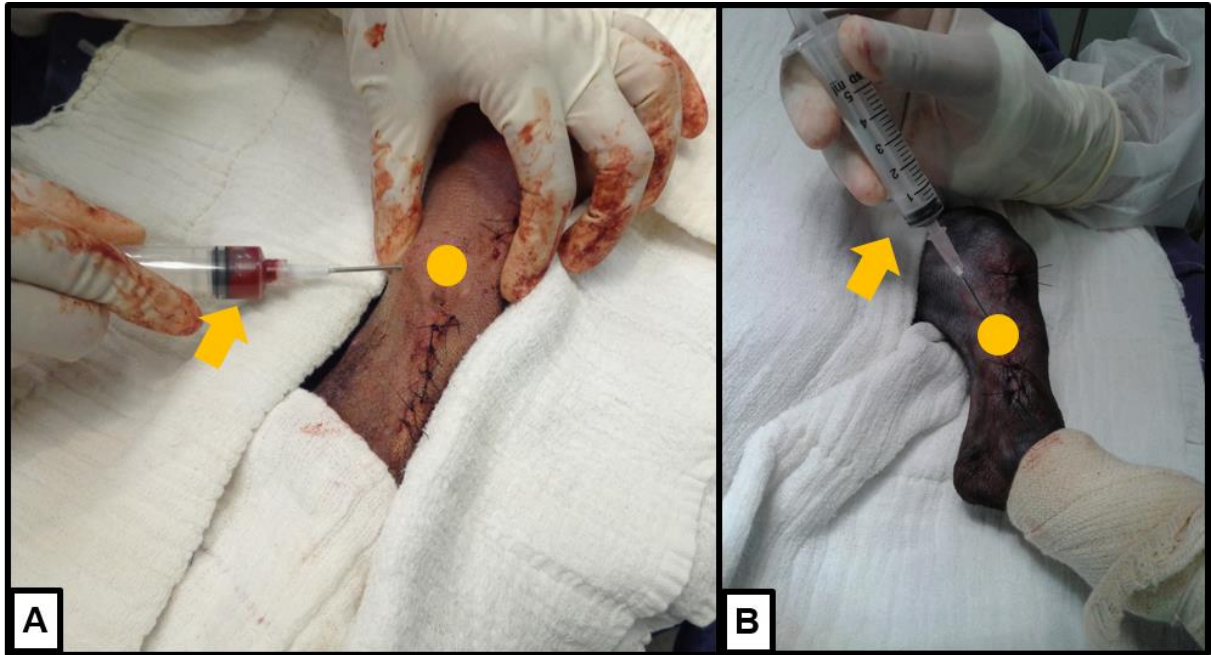


Figura 3. A. Imagem fotográfica da injeção percutânea de 2 mL de concentrado de medula óssea (seta amarela) no foco da fratura (círculo amarelo) após osteossíntese minimamente invasiva com placa na tíbia de um cão do grupo 2 (medula óssea). **B.** Após injeção percutânea de 2 mL de gel de quitosana (seta amarela) no foco da fratura (círculo amarelo). Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP. Jaboticabal, SP - 2015.

1.2.9.1 Prescrições pós-operatórias

Foram prescritos antibiótico (cefalexina²⁸ na dose de 25 mg/kg, a cada 12 horas) durante 10 dias, anti-inflamatório (meloxicam²⁹ na dose de 0,2 mg/kg no primeiro dia e 0,1 mg/kg nos demais dias, a cada 24 horas) durante três dias, e dipirona³⁰ (dose de 25 mg/kg a cada oito horas por sete dias) e cloridrato de tramadol (na dose de 3 mg/kg a cada oito horas por cinco dias) como analgésicos. Também foi

²⁸ Cefalexina – Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo/SP.

²⁹ Maxicam injetável 2% - Ouro Fino Saúde Animal Ltda. – Cravinhos/SP.

³⁰ Dipirona sódica – Laboratório Geyer, Porto Alegre/RS.

recomendada limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica³¹ e aplicação tópica de rifamicina³², uma vez ao dia durante 15 dias. As suturas cutâneas foram removidas no décimo quinto dia de pós-operatório.

1.2.10 Avaliação pós-cirúrgica

Todos as variáveis analisadas foram colocadas em uma ficha de avaliação de cada animal (Apêndice D) e transformadas em escores numéricos para posterior análise estatística.

1.2.10.1 Avaliação clínico cirúrgica

Os animais foram avaliados clinicamente, quanto à deambulação e ao edema do membro afetado, sempre pelo mesmo avaliador, antes da cirurgia (Momento 0 – M0), e após 15 dias (Momento 15 – M15), 30 dias (M30), 60 dias (M60), 90 dias (M90), e 120 dias (M120) da cirurgia.

Os pacientes foram avaliados com relação à intensidade da formação de edema no membro operado e à sua capacidade de deambulação de acordo com a escala adaptada de Dallabrida (2004) nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

³¹ Solução fisiológica cloreto de sódio a 0,9% - Química Farmacêutica Gaspar Viana S.A., São Paulo/SP.

³² Rifocina spray – Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda, Suzano/SP.

Quadro 1. Classificação em escores do grau de intensidade de edema (EDE) da ferida cirúrgica observado para avaliação pré e pós-operatória de cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e gel de quitosana nas fraturas da tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Grau de intensidade do edema	Descrição
Nulo (0)	Não há aumento de volume no local da cirurgia.
Discreto (1)	Aumento de volume no local da cirurgia.
Moderado (2)	Aumento de volume no local da cirurgia e região fraturada da tíbia;
Grave (3)	Aumento de volume no local da cirurgia, região da tíbia e porção distal do membro;

Fonte: Adaptado de DALLABRIDA, 2004.

Quadro 2. Classificação em escores do grau de deambulação (DEAM) clínica de acordo com características observadas para avaliação pré e pós-operatória de cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e gel de quitosana nas fraturas da tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Grau de deambulação	Descrição
1	Não se mantém em posição quadrupedal
2	Em pé, porém sem apoio do membro
3	Apoio do membro em posição quadrupedal, porém sem sua utilização ao caminhar
4	Uso claudicante do membro ao caminhar
5	Utilização do membro sem qualquer restrição

Fonte: Adaptado de DALLABRIDA, 2004.

1.2.10.2 Avaliação radiográfica

Avaliação radiográfica de ambas as tíbias, em incidências craniocaudal e mediolateral foi realizada no período pós-operatório imediato para avaliação do posicionamento e alinhamento do membro e da aplicação dos implantes. Exames radiográficos sequenciais, seguindo as mesmas projeções citadas anteriormente, foram realizados após 15 dias, 30 dias, 60 dias, 90 dias e 120 dias do procedimento cirúrgico, para avaliação do processo de consolidação óssea.

As radiografias foram analisadas quanto aos aspectos radiográficos descritos no quadro 3 e 4.

Quadro 3. Classificação em escores das características da avaliação radiográfica observadas nas radiografias nos momentos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e gel de quitosana nas fraturas de tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Aspectos radiográficos	Escore de avaliação
Radiopacidade na linha de fratura (RLF)	1- Radiotransparente 2- Radiodensa 3- Ausente
Localização do calo ósseo periosteal (LCO)	1- Medial 2- Lateral 3- Bilateral 4- Ausente
Presença de ponte óssea (PPO)	1- Medial 2- Lateral 3- Bilateral 4- Ausente
Restabelecimento das corticais (RC)	1- Medial 2- Lateral 3- Bilateral

	4- Ausente
Restabelecimento do canal medular (RCM)	1- Presente 2- Ausente
Remodelamento do calo ósseo (RCO)	1- Presente 2- Ausente
Volume do calo ósseo (VCO)	1- Pequeno 2- Moderado 3- Exuberante 4- Sem formação

Fonte: Adaptado de SENA (2006).

Quadro 4. Escala de avaliação radiográfica (EAR) de acordo com características da linha de fratura observadas nas radiografias em avaliação nos momentos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e gel de quitosana nas fraturas de tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Grau	Características da linha de fratura
1	Sem proliferação óssea
2	Presença de proliferação óssea, sem calo em ponte
3	Presença de proliferação óssea, com calo em ponte
4	Menor que 1 mm, com proliferação óssea, sem calo em ponte
5	Menor que 1 mm, com proliferação óssea, com calo em ponte (união clínica)
6	Ausência de linha de fratura

Fonte: Adaptado de Souza et al. (2011).

1.2.10.3 Avaliação por densitometria óptica

Para se estabelecer um padrão de avaliação da radiopacidade do calo ósseo foi utilizada a técnica de densitometria óptica (DO), utilizando um densímetro digital

MRA. Utilizou-se o Índice de Mineralização (IM) que consiste em um valor numérico relativo para a radiopacidade gerada na linha de fratura, tornando a avaliação das imagens radiográficas mais precisas. Para se determinar o valor de IM, foi feito uso de um gráfico (Figura 4), no qual o eixo X horizontal era constituído por valores de mineralização de 10 a 0, enquanto que o eixo Y vertical apresentava os valores médios de DO das imagens radiográficas. Foi então obtido um gráfico linear (Moraes, 2002) de equação $y = ax + b$, onde $b = y_1$ e $a = \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0}$, descrito por Ballaben (2014).

A área mais radiodensa e a área menos radiodensa em cada radiografia, foram submetidas à avaliação densitométrica e os valores obtidos lançados na fórmula matemática, obtendo-se assim o valor de a e b. Em seguida, o valor médio da DO, de cada radiografia, foi inserido nesta fórmula matemática de forma que, o valor de x encontrado correspondeu ao índice de mineralização da radiografia observada.

Para isso, padronizou-se a distância de 1 metro da ampola para a mesa do aparelho de Raios-X ³³ e a kilovoltagem e miliampéres para cada animal.

Exemplo:

$$x_0 = 10$$

$$x_1 = 0$$

$$y_0 = \text{região mais radiodensa da radiografia} = 0,30$$

$$y_1 = b = \text{região menos radiodensa da radiografia} = 2,12$$

$$y = \text{Média dos quatro pontos próximos ao foco da fratura em cada projeção} = 0,72$$

$$x = \text{índice de mineralização óssea em cada projeção radiográfica}$$

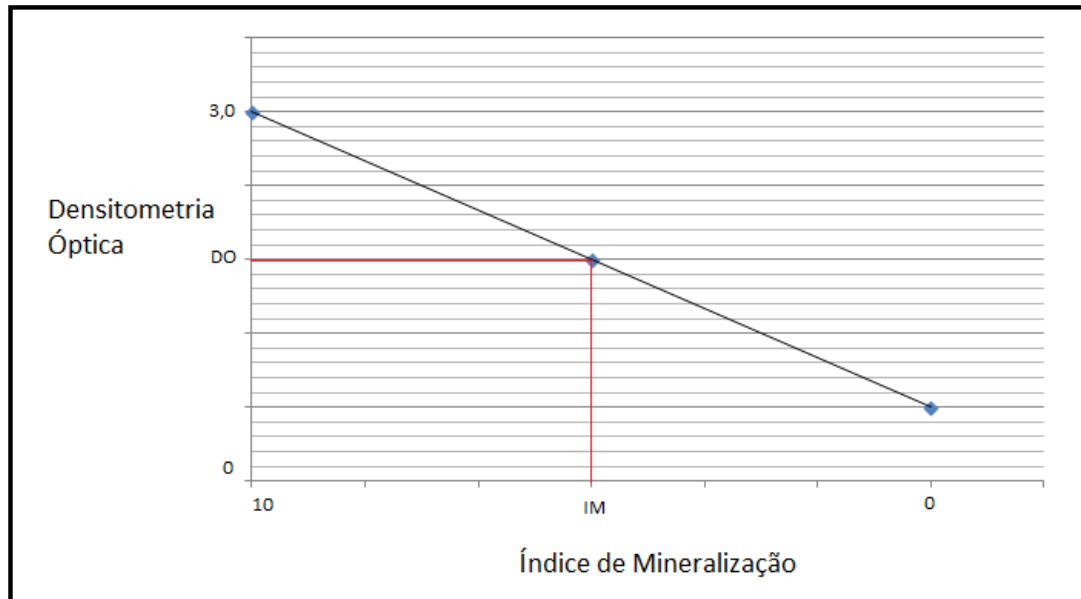
$$a = \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0}$$

$$a = \frac{2,12 - 0,30}{0 - 10} \quad a = -0,182$$

$$y = ax + b$$

$$0,72 = -0,182x + 2,12 \quad x = 7,70 = IMCC$$

³³ Aparelho de Raios-X marca “Siemens”, modelo *tridoros 812E* com capacidade para 800 mA, equipado com grade antidifusora “Polter-Bucky”, empregando-se filme TGM/RA montado em chassi metálico com écrans intensificador “Lanex” Regular.



Fonte: Moraes (2002).

Figura 4. Gráfico de determinação do Índice de Mineralização para avaliação da radiopacidade do calo ósseo formado nas radiografias de cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e gel de quitosana nas fraturas de tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

1.3 Análise estatística

O delineamento utilizado para análise das variáveis estudadas (EDE, DEAM, RLF, LCO, PPO, RC, RCO, RCM, VCO, EAR, IMCC, IMML) foi de parcelas subdivididas com medidas repetidas no tempo, testando o fator tratamento (4 níveis) nas parcelas e o fator momento (6 níveis) nas subparcelas, com 5 repetições por tratamento. O quadrado médio de animal dentro de tratamento foi usado como resíduo para testar o efeito de tratamento. Quanto às variáveis discretas, ou seja, todas exceto DOCC e DOML, estas foram antes das análises de variância, transformadas em $\sqrt[2]{resposta + 1}$. Havendo diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey no mesmo nível de significância (5%). Para

as referidas análises foi utilizado o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary NC, USA).

2. Produtividade (descrição das publicações relacionadas à pesquisa)

FILGUEIRA, F.G.F.; MINTO, B.W.; CHUNG, D.G.; PRADA, T.C.; ROSA, N.M.; AVANTE, M.L. Platelet rich plasm and bone marrow in minimally invasive osteosynthesis in the tibia of dogs. Preliminary results. In: 4th World Veterinary Orthopaedic Congress, 2014, Breckenridge. Proceedings of 4th World Veterinary Orthopaedic Congress, 2014. p. 85-85.

BALLABEM, N.M.R.; **FILGUEIRA, F.G.F.;** MINTO, B.W.; AVANTE, M.L. Minimally invasive osteosynthesis in the tibia of dogs. In: 5th World Veterinary Orthopaedic Congress, 2015, Sun Valey. Proceedings of 5th World Veterinary Orthopaedic Congress, 2015.

FILGUEIRA, F.G.F.; MINTO, B.W.; CHUNG, D.G. Aplicações percutâneas na ortopedia veterinária. Submetido a Revista Ciência Rural, 2015.

FILGUEIRA, F.G.F.; MINTO, B.W.; CAMPOS, M.G.N.; CHUNG, D.G.; PRADA, T.C.; BALLABEN, N.M.R.; AVANTE, M.L. Chitosan in minimally invasive plate osteosynthesis of the tibia of dogs. Aceito para apresentação em pôster no 32nd World Veterinary Congress, Istanbul, Turkey, september, 2015.

Referências

ALEIXO, G.A.S.; COELHO, M.C.O.C.; TEIXEIRA, M.N.; MESQUITA, E.P.; OLIVEIRA, F.F.; ZUBIETA, L.M.V.; ALMEIDA, T.L.C.; GUIMARÃES, A.L.N.; MAIA, F.C.; ZACARIAS, T.L.F.; SANTOS, S.M.L.G.; LIMA, C.P.S. Comparação entre dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas, em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.3, p.567-573, 2011.

BALLABEN, N.M.R. **Osteossíntese minimamente invasiva com placa bloqueada nas fraturas de tíbia em cães**. 2014. 62f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia

Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2014.

CHENITE, A.; CHAPUT, C.; WANG, D.; COMBES, C.; BUSCHMANN, M.D.; HOEMANN, C.D.; LEROUX, J.C.; ATKINSON, B.L.; BINETTE, F.; SELMANI, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, v. 21, n.21, p. 2155 – 2161, 2000.

DALLABRIDA, A. L. **Osteossíntese femural em cães através de transfixação esquelética interna: proposição de técnica**. 2004. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; DAIBERT, A. P. S.; PINHEIRO, L.C.P. Medula óssea autógena. Uma alternativa de enxerto na ortopedia veterinária. **Revista Ceres**, v.51, n.295, p.411-418, 2004.

MORAES, P. C. **Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos**. 2002, 73 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

SENA, M. P. T. **Fratura tibial e fibular de cão tratada com grampo de aço associado à cerclagem completa comparado à fixação com placa de neutralização**. 2006, 41 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SOUZA, T.F.B.; FERREIRA, G.T.N.M.; SAKAMOTO, S.S.; ALBUQUERQUE, V.B.; BOMFIM, S.R.M.; ANDRADE, A.L. Aspectos radiográficos e densitométricos de fraturas experimentais do rádio de cães tratadas com plasma rico em plaquetas. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.27, n.1, 001-006, 2011.

APÊNDICE C: Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Plasma rico em plaquetas, medula óssea ou quitosana nas osteossínteses minimamente invasiva com placa nas fraturas da tíbia em cães.

Nome da Pesquisadora: Fabrícia Geovânia Fernandes Filgueira

Orientador: Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto

Natureza da pesquisa: o Sr. (Sra.) está sendo convidado (a) a autorizar a participação de seu animal nesta pesquisa que tem como finalidade avaliar clinicamente e radiograficamente a utilização da Plasma rico em plaquetas, medula óssea e quitosana nas osteossínteses minimamente invasiva com placa nas fraturas de tíbia em cães.

1. Identificação do (s) animal (is):

Espécie: canino

Raça: _____

Nome/RG: _____

- 2. Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o (a) pesquisador (a) realize avaliação clínica pré-operatória do paciente, na sequencia será realizada a cirurgia para correção da fratura de tíbia com uso de pequenas incisões (pequenos cortes na pele, menor do que o tradicionalmente realizado), por onde será colocada uma placa bloqueada que estabilizará a fratura. Logo após, poderá ser injetado ou não no foco da fratura plasma rico em plaquetas, medula óssea ou gel de quitosana, que irão auxiliar no processo de consolidação óssea. Serão realizadas radiografias e exames de densitometria óptica no pós-operatório imediato, e nos retornos que serão após 15, 30, 60, 90 e 120 dias, no quais o animal será submetido a novas avaliações clínicas. O Sr. (Sra.) tem a liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).
- 3. Riscos e desconforto:** a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. O paciente estará sujeito a possíveis complicações anestésicas como qualquer outro procedimento tradicionalmente realizado para correção desse tipo de fratura. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei Federal 11.794, de 08 de outubro de 2008 e à Lei Estadual 11.977, de 25 de agosto de 2008.

4. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.
5. **Benefícios:** esperamos que este estudo obtenha informações importantes sobre as vantagens oferecidas por uma cirurgia ortopédica menos traumática, com menores riscos de infecção e complicações anestésicas, pois a cirurgia será realizada em tempo menor do que tradicionalmente realizada, de forma que será construído a partir desta pesquisa possa favorecer o avanço de técnicas ortopédicas, sendo mais uma opção viável para os ortopedistas quando estiverem frente com casos semelhantes, o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.
6. **Pagamento:** o Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Os custos que ficarão por conta do Sr. (Sra.) serão a taxa cirúrgica e anestésica, bem como exames complementares (avaliação pré-operatória como hemograma, perfil bioquímico para avaliar função renal e hepática, além das radiografias), também será responsável pelos custos com materiais necessários para a realização do procedimento cirúrgico. Esses custos são os mesmos que teriam se fosse optar por cirurgia ortopédica convencional para a correção da fratura do seu animal. Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto, preencha, por favor, os itens que seguem abaixo:

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

NOME DO PROPRIETÁRIO: _____

CPF/RG: _____

Assinatura do Proprietário (a)

Assinatura do Pesquisador (a)

Data: ____/____/____

TELEFONES

Pesquisadora Fabrícia Geovânia Fernandes Filgueira: (16) 8189-6033

Orientador: (16) 3209-2626 ramal 536 CEUA/UNESP: (16) 3209-2600

APÊNDICE D: Ficha de acompanhamento clínico-cirúrgico dos animais que
participaram do projeto de pesquisa

Ficha de acompanhamento clínico-cirúrgico do Projeto MIPO

Caso: _____
 Nome: _____ RG: _____
 Raça: _____ Idade: _____
 Nome do proprietário: _____ Telefone: _____
 Data do trauma: _____ Membro afetado: _____
 Tipo de trauma: _____
 Data da cirurgia: _____
 Cirurgião: _____
 Anestesista: _____

AVALIAÇÕES

M0-Data: _____
 AVALIAÇÃO DEAMBULATÓRIA: _____
 AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO EDEMA: _____
 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA
 Radiopacidade na linha de fratura: _____
 Localização do calo ósseo periosteal: _____
 Presença de ponte óssea: _____
 Restabelecimento das corticais: _____
 Restabelecimento do canal medular: _____
 Remodelamento do calo ósseo: _____
 Volume do calo ósseo: _____
 ESCALA DE AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA: _____
 OBSERVAÇÕES: _____

M 15-Data: _____
 AVALIAÇÃO DEAMBULATÓRIA: _____
 AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO EDEMA: _____

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Radiopacidade na linha de fratura: _____

Localização do calo ósseo periosteal: _____

Presença de ponte óssea: _____

Restabelecimento das corticais: _____

Restabelecimento do canal medular: _____

Remodelamento do calo ósseo: _____

Volume do calo ósseo: _____

ESCALA DE AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA: _____

OBSERVAÇÕES: _____

M 30-Data: _____

AVALIAÇÃO DEAMBULATÓRIA: _____

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO EDEMA: _____

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Radiopacidade na linha de fratura: _____

Localização do calo ósseo periosteal: _____

Presença de ponte óssea: _____

Restabelecimento das corticais: _____

Restabelecimento do canal medular: _____

Remodelamento do calo ósseo: _____

Volume do calo ósseo: _____

ESCALA DE AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA: _____

OBSERVAÇÕES: _____

M 60-Data: _____

AVALIAÇÃO DEAMBULATÓRIA: _____

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO EDEMA: _____

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Radiopacidade na linha de fratura: _____

Localização do calo ósseo periosteal: _____

Presença de ponte óssea: _____

Restabelecimento das corticais: _____

Restabelecimento do canal medular: _____

Remodelamento do calo ósseo: _____

Volume do calo ósseo: _____

ESCALA DE AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA: _____

OBSERVAÇÕES: _____

M 90-Data: _____

AVALIAÇÃO DEAMBULATÓRIA: _____

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO EDEMA: _____

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Radiopacidade na linha de fratura: _____

Localização do calo ósseo periosteal: _____

Presença de ponte óssea: _____

Restabelecimento das corticais: _____

Restabelecimento do canal medular: _____

Remodelamento do calo ósseo: _____

Volume do calo ósseo: _____

ESCALA DE AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA: _____

OBSERVAÇÕES: _____

M 120-Data: _____

AVALIAÇÃO DEAMBULATÓRIA: _____

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO EDEMA: _____

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Radiopacidade na linha de fratura: _____

Localização do calo ósseo periosteal: _____

Presença de ponte óssea: _____

Restabelecimento das corticais: _____

Restabelecimento do canal medular: _____

Remodelamento do calo ósseo: _____

Volume do calo ósseo: _____

ESCALA DE AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA: _____

OBSERVAÇÕES: _____

APÊNDICE E: A tabela que relaciona os trinta pacientes inclusos nos grupos experimentais, com a idade, peso corporal, raça, sexo e tipo de fratura de acordo com a classificação adotada pela AO/ASIF (PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009).

Tabela 1E. Idade, peso, raça, sexo e classificação das fraturas (AO/ASIF - PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009).), dos cães inclusos nos grupos experimentais (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e submetidos à osteossíntese minimamente invasiva com placa, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP – 2015.

Grupo Experimental	Animal	Idade (Meses)	Peso (Kg)	Raça	Sexo	Classificação da fratura
1	1	42	28	Labrador Retriever	Fêmea	4 2 C 1
1	2	8	25	Border Collie	Fêmea	4 2 B 2
1	3	12	20	SRD*	Macho	4 2 C 2
1	4	60	23	SRD	Fêmea	4 2 C 2
1	5	8	20	Labrador Retriever	Fêmea	4 2 B 2
1	6	60	20	SRD	Macho	4 2 A 2
1	7	11	15	Blue Heeler	Fêmea	4 2 A 2
1	8	7	10	SRD	Fêmea	4 2 A 2
2	1	5	07	SRD	Fêmea	4 2 A 2

2	2	6	06	SRD	Macho	4 2 A 2
2	3	60	5	Pinscher	Macho	4 2 A 2
2	4	60	20	SRD	Fêmea	4 2 C 2
2	5	8	13	SRD	Macho	4 2 A 2
2	6	24	14	SRD	Fêmea	4 2 A 1
2	7	12	10	Poodle	Macho	4 2 B 2
2	8	4	8	Blue Heeler	Fêmea	4 2 A 2
3	1	72	7	Dachshund	Macho	4 2 A 2
3	2	72	7	Dachshund	Macho	4 2 C 2
3	3	4	5,2	Poodle	Fêmea	4 2 A 2
3	4	9	16	SRD	Macho	4 2 C 2
3	5	48	8	SRD	Macho	4 2 C 2
3	6	60	5	SRD	Fêmea	4 2 A 1
3	7	108	9	Dachshund	Macho	4 2 A 2
3	8	84	22,5	SRD	Fêmea	4 2 C 2
4	1	8	30	Labrador Retriever	Macho	4 2 A 1
4	2	12	30	SRD	Macho	4 2 A 2
4	3	19	35	SRD	Fêmea	4 2 A 2

4	4	120	5,5	SRD	Fêmea	4 2 A 3
4	5	60	51	Fila Brasileiro	Macho	4 2 A 2
4	6	2	3,8	SRD	Fêmea	4 2 A 2

*SRD - sem raça definida.

APÊNDICE F: Resultado do preparo dos biomateriais

A contagem de células nucleadas antes, após a centrifugação e quanto concentrou em relação a contagem inicial está descrito na tabela 1F.

Tabela 1F. Contagem das células nucleadas dos animais do grupo 2 – medula óssea, antes, após a centrifugação e quanto concentrou das células nucleadas em porcentagem, submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Animal	Antes da centrifugação Células/ml	Após a centrifugação Células/ml	Concentração das células nucleadas (%)
1	21.269	331.060	15,56
2	23.940	3.208.229,5	134,01
3	22.902	2.008.860	87,71
4	18.375	686.700	37,37
5	7.021,25	96.350	13,72
6	105.000	112.750	1,07
7	30.975	1.699.440	54,86
8	70.007,5	487.900	6,96

A tabela 2F mostra a contagem plaquetas antes, após o protocolo de centrifugação e quantas vezes concentrou as plaquetas em porcentagem.

Tabela 2F. Contagem das plaquetas dos animais do grupo 3 – plasma rico em plaquetas, antes, após do protocolo de confecção e quanto vezes concentrou em relação a contagem inicial, submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Animal	Sangue periférico	PRP	Concentração das plaquetas (%)
1	131.000	507.000	3,87
2	131.000	507.000	3,87
3	208.000	545.000	2,62
4	299.000	1.151.000	3,84
5	359.000	832.000	2,31
6	227.000	965.000	4,25
7	196.000	731.000	3,72
8	315.000	810.000	2,57

APÊNDICE G: Implantes utilizados nos animais dos grupos experimentais

Os implantes foram utilizados na função ponte, onde a placa recebeu todas as cargas biomecânicas que passam para o osso. Foram provenientes da mesma empresa em todos os animais, mostrando na Tabela 1G a descrição dos implantes de acordo com o paciente.

Tabela 1G. Descrição da espessura da placa bloqueada (mm), número de furos e quantidades de furos preenchidos com parafusos nos fragmentos proximal e distal. Esses implantes foram utilizados nos animais submetidos à osteossíntese minimamente invasiva associada à medula óssea, plasma rico em plaquetas e quitosana nas fraturas de tíbia, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Grupo experimental	Paciente	Espessura da placa (mm)	Número de furos na placa	Quantidade de parafusos nos fragmentos ósseos	
				Proximal	Distal
1	1	3.5	12	3	4
1	2	3.5	10	2	2
1	3	2.7	9	2	3
1	4	3.5	12	2	3
1	5	3.5	11	2	3
1	6	4.5	12	3	2
1	7	2.7	10	3	2
1	8	2.7	7	2	2
2	1	2.7	7	2	2
2	2	2.0	10	2	3
2	3	2.0	10	4	2
2	4	3.5	10	3	3
2	5	2.7	8	2	3
2	6	3.5	12	3	2
2	7	2.7	6	2	2

2	8	2.4	9	2	2
3	1	2.0	7	3	2
3	2	2.0	8	2	2
3	3	2.0	10	3	2
3	4	2.7	10	2	3
3	5	2.7	7	2	2
3	6	2.0	10	3	3
3	7	2.4	7	2	2
3	8	3.5	12	3	2
4	1	3.5	11	3	3
4	2	3.5	11	3	3
4	3	4.5	12*	3	2
4	4	2.0	9	3	2
4	5	4.5	14*	4	3
4	6	2.0	9	2	2

* Placa de espessura de 4,5 com furos e parafusos de 3,5.

APÊNDICE H: A avaliação clínica quanto à intensidade do edema no membro após a cirurgia e a capacidade de deambulação dos pacientes estão amostrados nas tabelas 1H e 2H.

Tabela 1H. Médias e desvio padrão da intensidade da formação do edema comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Médias e desvio padrão da intensidade da formação do edema						
Grupos	Momentos					
	0	15	30	60	90	120
1	2.00±0.92	1.00±0.63	0.0±0.0	0.0±0.0	0.42±0.78	0.12±0.35
2	2.00±0.53	0.87±0.99	0.12±0.35	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
3	2.50±0.53	1.28±0.95	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
4	2.33±0.51	1.00±0.89	0.33±0.51	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 2H. Médias e desvio da avaliação deambulatória comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Médias e desvio da avaliação deambulatória						
Grupos	Momentos					
	0	15	30	60	90	120
1	1.62±0.51	3.66±1.36	4.42±0.53	4.83±0.40	4.71±0.48	4.87±0.35
2	1.87±0.35	4.37±0.91	4.87±0.35	5.00±0.0	5.00±0.0	4.71±0.75
3	1.37±0.74	3.42±1.71	4.50±0.75	4.85±0.37	4.60±0.89	5.00±0.0
4	1.50±0.54	3.50±1.22	4.33±0.81	5.00±0.0	5.00±0.0	5.00±0.0

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

APÊNDICE I: Os resultados estatísticos das variáveis radiográficas radiopacidade da linha da fratura (RLF), localização do calo ósseo periosteal (LCO), presença de ponte óssea (PPO), restabelecimento das corticais (RC), remodelamento do calo ósseo (RCO), volume do calo ósseo (VCO) e a escala de avaliação radiográfica (EAR) estão listados nas tabelas 1I, 2I, 3I, 4I, 5I, 6I e 7I, respectivamente.

Tabela 1I. Médias e desvio padrão da variável RLF (radiopacidade da linha de fratura) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Médias e desvio padrão da variável RLF (radiopacidade da linha de fratura)						
Grupos	Momentos					
	0	15	30	60	90	120
1	3.00±0.0	1.66±1.03	1.85±1.06	2.00±0.0	2.00±0.57	1.87±0.64
2	2.50±0.92	1.87±0.83	2.00±0.53	2.40±0.54	2.33±0.81	2.42±0.97
3	3.00±0.0	1.85±1.06	2.00±0.53	2.00±0.0	2.20±0.44	2.16±0.75
4	3.00±0.0	2.83±0.40	1.83±0.98	2.00±0.63	2.2±0.44	2.40±0.54

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 4I. Médias e desvio padrão da variável RC (restabelecimento das corticais) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Médias e desvio padrão da variável RC (restabelecimento das corticais)						
Grupos	Momentos					
	0	15	30	60	90	120
1	3.62±1.06	4.00±0.0	3.57±1.13	2.83±1.69	3.00±0.57	3.12±0.35
2	4.00±0.0	3.75±0.46	2.50±1.06	2.80±0.44	2.83±0.40	3.00±0.0
3	4.00±0.0	3.71±0.75	3.37±0.74	2.28±0.95	3.00±0.0	3.00±0.0
4	4.00±0.0	3.83±0.40	3.66±0.51	2.33±0.81	2.60±1.14	3.20±1.44

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 5I. Médias e desvio padrão da variável RCO (remodelamento do calo ósseo) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Médias e desvio padrão da variável RCO (remodelamento do calo ósseo)						
Grupos	Momentos					
	0	15	30	60	90	120
1	2.00±0.0	2.00±0.0	1.85±0.37	1.16±0.40	1.14±0.37	1.12±0.35
2	2.00±0.0	2.00±0.0	1.62±0.51	1.20±0.44	1.16±0.40	1.14±0.37
3	2.00±0.0	1.71±0.48	1.62±0.51	1.28±0.48	1.00±0.0	1.00±0.0
4	2.00±0.0	2.00±0.0	1.66±0.51	1.16±0.40	1.00±0.0	1.00±0.0

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 7I. Médias e desvio padrão da variável EAR (escala de avaliação radiográfica) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva, Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Médias e desvio padrão da variável EAR (escala de avaliação radiográfica)						
Grupos	Momentos					
	0	15	30	60	90	120
1	0.0±0.0	1.16±2.04	1.57±0.71	4.66±2.06	5.28±1.49	5.75±0.46
2	0.0±0.0	1.87±1.80	4.25±1.83	5.60±0.54	5.00±2.00	5.28±1.88
3	0.0±0.0	1.14±1.21	2.50±1.85	4.00±1.41	5.00±1.73	5.66±0.51
4	0.0±0.0	1.16±1.94	2.50±2.50	4.50±1.37	5.60±0.54	6.00±0.0

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

APÊNDICE J: Resultados da avaliação por densitometria óptica

Os resultados dos índices de mineralização óssea na projeção craniocaudal e mediolateral estão descritos nas tabelas 1J e 2J, respectivamente.

Tabela 1J. Médias e desvio padrão dos valores obtidos para o índice de mineralização nas radiografias em projeção craniocaudal (IMCC) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Médias e desvio padrão do índice de mineralização óssea em projeção craniocaudal (IMCC)						
Grupos	Momentos					
	0	15	30	60	90	120
1	6.88±1.67	8.79±0.45	9.08±0.51	8.51±0.30	8.09±0.70	8.44±0.62
2	6.19±2.36	7.52±2.13	7.30±2.87	7.00±2.97	7.89±1.62	7.40±1.21
3	6.93±1.08	7.14±1.61	7.60±1.20	7.34±1.40	6.75±0.80	6.52±0.99
4	7.11±1.86	8.50±1.23	7.57±2.34	8.18±1.30	8.27±1.34	8.74±1.33

Tabela 2J. Médias e desvio padrão dos valores obtidos para o índice de mineralização nas radiografias em projeção mediolateral (IMML) comparada entre os grupos (1 – grupo controle, 2 – grupo medula óssea, 3 – grupo plasma rico em plaquetas e 4 – grupo quitosana) e os momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120) pelo Teste de Tukey a 5% no pós-operatório, em cães submetidos à osteossíntese minimamente invasiva. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – UNESP, Jaboticabal-SP, no período de março de 2012 a maio de 2015. Jaboticabal, SP - 2015.

Médias e desvio padrão do índice de mineralização óssea em projeção mediolateral (IMML)						
Grupos	Momentos					
	0	15	30	60	90	120
1	5.84±1.29	7.53±0.90	7.39±1.64	7.60±1.34	7.68±0.87	7.55±1.28
2	6.13±1.42	6.86±1.63	6.44±2.82	7.28±1.80	7.52±1.46	7.64±1.29
3	5.17±1.45	6.78±1.65	7.03±1.47	6.80±1.18	6.08±1.12	6.09±1.29
4	6.27±1.90	8.16±1.75	6.79±2.01	7.52±1.22	7.66±1.21	8.07±1.32

ANEXOS

ANEXO 1: Normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia



ISSN 0102-0935 *versão*

impressa

ISSN 1678-4162 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Política Editorial](#)
- [Reprodução de artigos publicados](#)
- [Orientação para tramitação de artigos](#)
- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Preparação dos textos para publicação](#)
- [Formatação do texto](#)
- [Seções de um artigo](#)
- [Taxas de submissão e de publicação](#)
- [Recursos e diligências](#)

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto **não** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação;
2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco.

Introdução: Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Figura: Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **sem** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, adaptadas para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- ù dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)

- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação: Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já **citada por** outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal: Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como "Desistência do Autor" artigos em diligência e/ou "Aguardando liberação do autor", que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

© 2001-2007 Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567

30123-970 Belo Horizonte MG Brasil

Tel: +55 31 3409-2042

Tel: +55 31 3409-2041



abmvz.artigo@abmvz.org.br

ANEXO 2: Normas do periódico Revista Ciência Rural



Normas para publicação

<http://coral.ufsm.br/ccrrevista/normas.htm>

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via [eletrônica](#) e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

4. A revisão bibliográfica (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

5. A nota (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

6. O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar **obrigatoriamente** as seguintes informações:

- a) Qual o **problema** científico estudado neste manuscrito?
- b) Qual a **abordagem** empregada para resolver o problema estudado?
- c) Quais os principais **resultados/conclusões** do estudo que possam encorajar ao editor enviar o manuscrito para revisores?
- d) Qual é a **contribuição** à ciência que justifica a publicação do manuscrito como artigo na Ciência Rural?

Para maiores informações acesse o seguinte [tutorial](#).

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

10.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

10.2.Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

10.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

10.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests ***Tribolium confusum*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Tenebrio molitor*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Sitophilus granarius*** (Coleoptera: Curculionidae) and ***Plodia interpunctella*** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de ***Sitophilus oryzae*** (L.), ***Cryptolestes ferrugineus*** (Stephens) e ***Oryzaephilus surinamensis*** (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

10.5.

Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

10.6.

Tese,

dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

10.7.

Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

10.8.

Informação

verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre

parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

10.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow dysplasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

11. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

12. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

15. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.
19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a [taxa de tramitação](#). Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Ressubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente.

Ciência Rural

Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais

Prédio 42, Sala 3104 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil

E-mail: cienciarural@mail.ufsm.br

Fone/Fax: (55) 32208698

Fax: (55) 32208695

ANEXO 3: Classificação da fratura de acordo com AO/ASIF

Location, Fracture Morphology, and Severity

The system used for location, morphology, and severity of long-bone fractures is based on the classification system adopted by AO Vet, which was developed to allow fractures to be alphanumerically coded for easy data retrieval by computer.² It is based on the system used by the Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese und Association for the Study of Internal Fixation (AO/ASIF) group for documentation of human fractures.⁴ It permits grading of the complexity of fracture configuration and relative stability after reduction, thus providing information regarding appropriate treatment and prognosis (Table 2-1).

Localization of the fracture is provided by numbering each long bone (1, humerus; 2, radius/ulna; 3, femur; 4, tibia/fibula) and dividing each bone into 1, proximal; 2, shaft; and 3, distal zones. As a measure of severity, each fracture is typed as A, simple; B, wedge; or C, complex (Figure 2-1). Each grade is further grouped into three degrees of complexity (e.g., A1, A2, A3) depending on the type and extent of bone fragmentation. Thus the simplest shaft fracture of the humerus would be characterized as "1 2 A1." Proximal and distal zones may require individual descriptions to accommodate the specific bone morphology (Figure 2-2).

Additional specific *nomenclature* can be applied to each of these descriptions to convey more information. The orientation of the fracture line relative to the bone's

TABLE 2-1. THE AO VET ALPHANUMERIC MORPHOLOGICAL FRACTURE CLASSIFICATION SYSTEM

Localization			Fracture Morphology	
Bone 1 2 3 4	Segment 1 2 3	=	Type A B C Group A1, A2, +++C3	Subdivision 1 2 3

Redrawn from Unger M, Montavon PM, Heim UFA: *Vet Comp Orthop Trauma* 3:41-50, 1990.



FIGURE 2-1. Diaphyseal fracture types. A, Simple fracture. B, Wedge fracture. C, Complex fracture. (Redrawn from Unger M, Montavon PM, Heim UFA: *Vet Comp Orthop Trauma* 3:41-50, 1990.)

Fonte: PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009.