

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 12/03/2021.

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

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALÓGENAS
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NAS OSTEOSSÍNTESES
MINIMAMENTE INVASIVAS NA TÍBIA DE CÃES**

Guilherme Galhardo Franco
Médico Veterinário

2019

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

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALÓGENAS
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NAS OSTEOSSÍNTESES
MINIMAMENTE INVASIVAS NA TÍBIA DE CÃES**

Discente: Guilherme Galhardo Franco

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
Doutor em Cirurgia Veterinária**

2019

F825c Franco, Guilherme Galhardo
Células-tronco mesenquimais alógenas derivadas de tecido adiposo nas osteossínteses minimamente invasivas na tíbia de cães / Guilherme Galhardo Franco. -- Jaboticabal, 2019
113 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Bruno Watanabe Minto

1. Cão. 2. Osteossíntese. 3. Terapia celular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

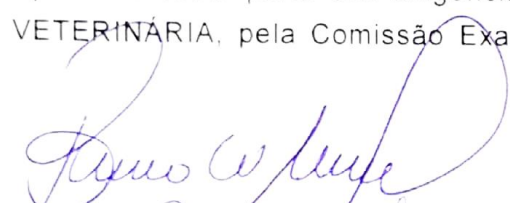
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

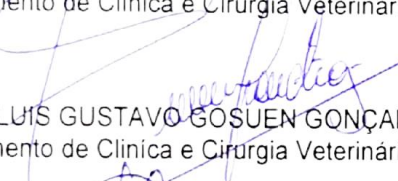
TÍTULO DA TESE: CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALÓGENAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO NAS OSTEOSSÍNTESES MINIMAMENTE INVASIVAS NA TÍBIA DE CÃES

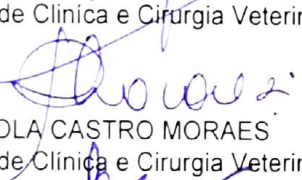
AUTOR: GUILHERME GALHARDO FRANCO

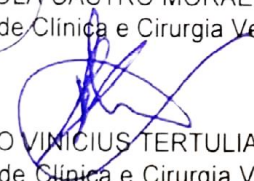
ORIENTADOR: BRUNO WATANABE MINTO

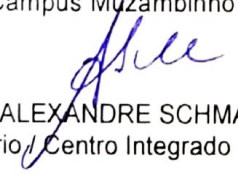
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. LUIS GUSTAVO GOSSEN GONÇALVES DIAS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / Unesp - Jaboticabal


Prof. Dr. PAULO VINICIUS TERTULIANO MARINHO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Muzambinho / Muzambinho/MG


Pesquisador Dr. ALEXANDRE SCHMAEDECKE
Médico Veterinário / Centro Integrado de Especialidades Veterinárias / Curitiba/PR

Jaboticabal, 12 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Guilherme Galhardo Franco, nascido em 2 de abril de 1990, no município de São Paulo, estado de São Paulo. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), câmpus de Botucatu, em março de 2008. No mesmo câmpus, participou da diretoria e atividades da Atlética da Medicina Veterinária, ocupando diferentes cargos, além da participação no Grupo de Estudos em Pequenos Animais (GEPA) durante 4 anos como membro da diretoria. Em dezembro de 2012 obteve o título de Médico Veterinário. Iniciou o programa de Residência em Cirurgia de Pequenos Animais na UNESP câmpus de Botucatu em março de 2013, concluindo-o em fevereiro de 2015. Iniciou o mestrado em Cirurgia Veterinária em março de 2015 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal, concluindo em fevereiro de 2017. Iniciou o doutorado em Cirurgia Veterinária em março de 2017 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal, que está em curso. Atualmente ocupa o cargo efetivo de Técnico-Administrativo em Educação, Médico Veterinário, Setor de Lotação – Hospital Veterinário, Área de concentração Cirurgia de Pequenos Animais, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – câmpus de Alegre.

EPÍGRAFE

“A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens, mas em
ter novos olhos”.

Marcel Proust

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha querida noiva
Beth, aos meus pais Aparecida e Paulo e ao
meu irmão Gustavo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me deu força, saúde e paz para conduzir este trabalho da maneira mais prazerosa possível.

Agradeço ao meu grande amigo, orientador e mentor Prof. Bruno Watanabe Minto, o qual me ensina e me inspira desde o início da minha jornada na medicina veterinária.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” que desde a graduação, passando pela residência, mestrado e agora o doutorado, fomentou meus estudos dando o suporte necessário para minha formação profissional.

Ao programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Unesp câmpus de Jaboticabal que me deu a oportunidade de desenvolver um trabalho com a interação de diferentes disciplinas contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia de Pequenos Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, o qual me ajudou bastante na execução do trabalho.

Aos meus colegas de Laboratório Fernando, Arícia, Paula, Luís Guilherme, João, Lívia, Lúcia, Rafael, Carol, Maria Eduarda, Mateus, Aline, Fabrícia, Felipe, Pedro e Dayvid, pela imensa ajuda em toda execução do trabalho e por contribuir na formação de uma equipe de trabalho maravilhosa.

Aos residentes e funcionários do serviço de cirurgia de pequenos animais pela ajuda nas cirurgias e acompanhamentos dos casos deste trabalho.

Agradeço pela imensa ajuda dos funcionários e do serviço de Imagem do Hospital Veterinário Governador Laudo Bento Natel, pela ajuda na realização dos exames radiográficos.

Ao professor Luís Gustavo Gosuen Gonçalves Dias e Professora Paola Castro Moraes, pela participação e ajuda neste trabalho.

À Patrícia Maillard e ao Maurício Peixer, gestores executivos da BIO Cell e BIO Biotecnologia Animal, por toda ajuda, carinho, apoio, parceria e ensinamentos ao longo de toda essa jornada do mestrado e doutorado.

À CNPq pela bolsa de doutorado, sem a qual seria impossível a realização desta pesquisa.

À minha querida noiva Elizabeth Regina Carvalho. Minha Companheira sempre. Esteve comigo em todas as etapas desta pesquisa, me ajudando, me incentivando e me apoiando nos momentos mais felizes e mais difíceis. Obrigado por tornar meus dias mais especiais. Te amo muito.

Aos meus queridos pais que sempre me ajudaram e me apoiaram em toda minha jornada e são os responsáveis por tudo que sou.

Às minhas queridas avós Luzia Dias Gomes e Aparecida Bernini, que apesar de não estarem mais entre nós, sou muito grato pelo amor e cuidado incondicional que tinham por mim.

Ao meu irmão Gustavo por sempre estar ao meu lado o por todos os momentos de companheirismo.

Aos animais e seus tutores deste experimento, os quais permitiram a execução deste estudo e, assim contribuíram para o avanço da ciência.

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho de doutorado faz parte das obrigações para obtenção do título de doutor em Cirurgia Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – câmpus de Jaboticabal – SP. Ele está dividido em capítulos para melhor compreensão e apresentação dos resultados. No capítulo 1 (um) estão presentes as considerações gerais, contendo introdução, revisão de literatura, objetivos e hipóteses; o capítulo 2 (dois) consiste no primeiro artigo científico; o capítulo 3 (três) consiste no segundo artigo científico; e o capítulo 4 (quatro) corresponde às considerações finais.

SUMÁRIO

	Página
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
Introdução.....	1
Revisão de literatura.....	2
Objetivos.....	5
Objetivos específicos.....	5
Hipótese.....	6
Referências.....	6
CAPÍTULO 2 – Avaliação prospectiva da Osteossíntese Minimamente Invasiva com Placa (MIPO) associada à terapia celular com células tronco mesenquimais alógenas derivadas de tecido adiposo em fraturas de tíbia em cães	10
Resumo.....	10
Introdução.....	11
Material e métodos.....	12
Animais.....	12
Planejamento pré-operatório.....	13
Obtenção das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.....	14
Obtenção de tecido adiposo do cão doador.....	14
Processamento do tecido adiposo e cultivo celular.....	14

Descongelamento para a aplicação percutânea das CTM-AD no foco de fratura.....	16
Técnica cirúrgica.....	16
Avaliação pós-operatória.....	19
Análise estatística.....	24
Resultados.....	24
Discussão.....	29
Conclusão.....	38
Referências.....	38
 CAPÍTULO 3 – Comparação entre a aplicação percutânea de células-tronco mesenquimais alógenas derivadas de tecido adiposo ou aplicação percutânea de concentrado de medula óssea autóloga em fraturas de tíbia em cães tratados com osteossíntese minimamente invasiva com placa: estudo de coorte.....	46
Resumo.....	46
Introdução.....	47
Material e métodos.....	48
Obtenção, cultivo, e descongelamento das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.....	49
Obtenção e aplicação do concentrado de medula óssea autóloga (MO).....	52
Técnica cirúrgica.....	53
Avaliações pós-operatórias.....	56
Análise Estatística.....	59
Resultados	60
Discussão.....	66
Conclusão.....	72
Referências.....	72

CAPÍTULO 4 – Considerações finais.....	78
Limitações do estudo.....	78
Perspectivas.....	78
ANEXO 1 - Normas do periódico <i>Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology</i> (VCOT).....	80

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Células-tronco mesenquimais alógenas derivadas de tecido adiposo nas osteossínteses minimamente invasivas na tíbia de cães"**, protocolo nº 19864/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 02 de fevereiro de 2017.

Vigência do Projeto	01/03/2017 a 28/02/2020
Espécie / Linhagem	<i>Canis familiaris</i>
Nº de animais	20
Peso / Idade	-
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Rotina cirúrgica do HV"GLN" – FCAV – Unesp.

Jaboticabal, 02 de fevereiro de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALÓGENAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO NAS OSTEOSSÍNTESES MINIMAMENTE INVASIVAS NA TÍBIA DE CÃES

RESUMO - O tratamento das fraturas, especialmente aquelas causadas por traumas de alta energia, permanece como grande desafio aos cirurgiões médicos e veterinários. A busca por terapias adjuvantes, assim como técnicas que possam aprimorar os índices de sucesso, é fundamental na minimização das potenciais complicações. O objetivo desse estudo foi avaliar a reparação óssea após a realização da técnica de osteossíntese minimamente invasiva com placa (MIPO) associada à aplicação percutânea, no foco de fratura, de células-tronco mesenquimais alógenas derivadas de tecido adiposo (CTM-AD), em fraturas de tíbia de cães e posteriormente, comparar com a aplicação percutânea de concentrado de medula óssea autóloga. Foram utilizados 29 cães que apresentaram fraturas completas e fechadas da tíbia, as quais foram tratadas com MIPO e aplicação percutânea, no foco de fratura, de 3 milhões de CTM-AD alógenas ou 2 mL de concentrado de medula óssea autóloga (MO). Os exames radiográficos foram realizados no momento imediato após a cirurgia e 15, 30, 60, 90 e 120 dias pós-operatórios e avaliados quanto à aposição dos fragmentos, presença de desvios angulares, evolução da união óssea e complicações. A análise dos resultados dos 20 cães do grupo CTM-AD mostrou que a aposição dos fragmentos foi boa em 60% dos casos, adequada em 35% dos casos e inaceitável em 5% dos casos. O tempo médio de união clínica radiográfica foi de $28 \pm 12,8$ dias. Em 60% dos casos foi observada reação periosteal moderada, demonstrando organizada atividade osteogênica no foco de fratura com 15 dias de pós-operatório. Somente em 1 caso (5%) ocorreram desvios angulares moderados após a fixação da fratura, porém sem repercussões clínicas. Complicações menores incluíram seroma (5%) e soltura de um parafuso (10%), e complicações maiores incluíram a inserção do parafuso mais proximal no espaço articular do joelho (10%). Em relação à comparação entre as CTM-AD e MO, o tempo mediano de união radiográfica entre os grupos foi similar (30 dias). Entretanto, na escala de união radiográfica (RUST) das radiografias de 30 dias de pós-operatório, o grupo CTM-AD apresentou escore final médio superior ($p < 0,05$). Conclui-se que a associação da terapia celular com CTM-AD alógena e MIPO se mostrou uma alternativa viável, eficaz e segura em promover a reparação óssea em fraturas não articulares de tíbia em cães.

Palavras-chave: aplicação percutânea, cão, consolidação óssea, osteossíntese biológica, terapia celular

ALLOGENIC ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IN MINIMALLY INVASIVE OSTEOSYNTHESIS OF THE TIBIA IN DOGS

ABSTRACT - Treating fractures, especially those caused by high energy trauma, remains a major challenge to medical and veterinary surgeons. Adjuvant therapies as well as techniques that can improve success rates are fundamental at minimizing potential complications. The aim of this study was to evaluate bone healing after minimally invasive plate osteosynthesis (MIPO) associated with percutaneous application, in the fracture site, of allogenic adipose derived mesenchymal stem cells (AD-MSC), in the tibia of dogs, and then, to compare with an application of autologous bone marrow concentrate (BMC). Twenty-nine dogs with complete and closed tibial fractures were used, which were treated with MIPO and percutaneous application of 3 million allogeneic AD-MSC or 2 mL of autologous BMC. Radiographic examinations were performed immediately after surgery and 15, 30, 60, 90 and 120 postoperatively. Fragments apposition, angular and rotational deviations, bone union evolution and complications were evaluated. Apposition was considered good in 60% of cases, adequate in 35% and unacceptable in 5%. The mean radiographic union time was 28 ± 12.8 days. In 60% of the cases, a moderate periosteal reaction was observed, showing organized osteogenic activity at the fracture site 15 days postoperatively. In only 1 case (5%), moderate angular deviations occurred after fracture fixation, but without clinical issues. Minor complications included seroma (5%) and a screw pullout (10%), and major ones included an insertion of the most proximal screw in the joint space of the knee (10%). Regarding the comparison between AD-MSC and BMC, median time of radiographic union between groups was similar (30 days). However, in the radiographic union scale (RUST) of the 30th day postoperative radiographs, the CTM-AD group had a superior final mean score ($p < 0.05$). In conclusion, the association of cell therapy with AD-MSC and MIPO seems to be a feasible and effective alternative to improve bone healing in non-articular tibial fractures in dogs.

Keywords: percutaneous application, dog, bone healing, fracture, biological osteosynthesis, cell therapy

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

Introdução

Na presença de ambiente biológico e mecânico apropriados, os processos naturais de reparação óssea são suficientes para efetuar a restauração completa da integridade do esqueleto para a maioria das fraturas (Giannoudis et al., 2007). No entanto, algumas situações exigem intervenção apropriada para potencializar os mecanismos fisiológicos de reparação e regenerar grandes quantidades de osso (Kraus e Kirker-Head, 2006).

Abordagens cirúrgicas abertas e invasivas necessárias para a reconstrução anatômica da fratura danificam o hematoma inicial, bem como o fornecimento extra ósseo de sangue para a região (Garofolo e Pozzi, 2013). Este trauma iatrogênico pode retardar a taxa de formação de osso novo e desvitalizar fragmentos que, potencialmente poderiam permanecer viáveis caso o local da fratura não fosse manipulado (Mizuno et al., 1990).

Assim, abordagens mais cautelosas, tais como a “abra, mas não toque” (“*Open, But Do Not Touch*” – OBDNT), foram encorajadas. Entretanto, ainda buscava-se menor grau de manipulação dos tecidos, para maximizar o potencial de regeneração e reduzir as taxas de complicações (Palmer, 1999). Uma opção encontrada, para casos selecionados, foi a abordagem conhecida como osteossíntese minimamente invasiva (*Minimally Invasive Osteosynthesis* –MIO), que obedece aos princípios de fixação interna biológica (Perren, 2002).

Estudos sobre a regeneração óssea ganham cada vez mais ênfase na ortopedia. O principal desafio é a diminuição no tempo de consolidação e diminuir os índices de complicações. Na área da ortopedia veterinária, esta necessidade se torna ainda maior. A dificuldade em se promover repouso adequado aos pacientes e, dessa forma, impedir a sobrecarga precoce aos implantes, pode aumentar o risco de complicações após a fixação cirúrgica terapêutica (Crocì et al., 2003).

Biomateriais e outras estratégias facilitadoras da regeneração são cada vez mais estudados e utilizados para potencializar os eventos da união óssea secundária e alcançar o resultado desejado (Venkatesan et al., 2016). Nos últimos anos, as

células-tronco mesenquimais (CTM) têm emergido como ferramenta terapêutica, devido às suas propriedades biológicas e às necessidades médicas (Levi e Longaker, 2011). As razões para seu uso são inúmeras, e pode-se destacar: fácil isolamento e expansão em cultura, multipotencialidade, efeitos parácrinos, propriedades imunomodulatórias e capacidade de migração (Pittenger et al., 1999).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram resultados promissores na melhoria do processo de reparação óssea utilizando a terapia celular associada aos biomateriais (Venkatesan et al., 2016). Entretanto, mais estudos clínicos e *in vivo* são necessários para determinar o real potencial terapêutico na ortopedia veterinária.

Conclusão

Ambos os grupos apresentaram rápido e eficaz processo de reparação óssea nas fraturas de tíbia com baixo índice de complicações, observados nas radiografias pós-operatórias seriadas até 120 dias. O grupo CTM apresentou maior escore final RUST aos 30 dias, demonstrando maior qualidade e precocidade na formação do calo ósseo. Estes resultados sugerem que a terapia celular associada às técnicas de osteossíntese biológica se mostraram uma alternativa viável, eficaz e segura em promover a reparação óssea em fraturas não articulares de tíbia em cães.

Referências

1. Schmökel HG, Hurter K, Schawalder P. Percutaneous plating of tibial fractures in two dogs. Vet Comp Orthop Traumatol. 2003 Jul;16(3):191–5.

2. Schmökel HG, Stein S, Radke H, Hurter K, Schawalder P. Treatment of tibial fractures with plates using minimally invasive percutaneous osteosynthesis in dogs and cats. *J Small Anim Pract* [Internet]. 2007;48(3):157–60.
3. Hudson CC, Pozzi A, Lewis DD. Minimally invasive plate osteosynthesis : Applications and techniques in dogs and cats. 2009;175–82.
4. Zamprogno H. Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas Skeletal stem cells for the treatment of nonunion fractures in dogs. 2007;d(Supl 2):289–90.
5. Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimble JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11(3):140–50.
6. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermothaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone* 2015;70:93–101.
7. Hutton DL, Grayson WL. Stem cell-based approaches to engineering vascularized bone. *Curr Opin Chem Eng* 2014 Feb;3:75–82.
8. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg* 2006;35(3):232–42.
9. Rolim Filho EL, Larrazabal MC de A, Costa LF da, Santos SM dos, Santos RM dos, Aguiar JL de A. Effect of autologous stem cells on regenerated bone during distraction osteogenesis by Ilizarov technique in the radius of dogs. Histomorphometric analysis. *Acta Cir Bras*. 2013 Aug;28(8):574–81.
10. Levi B, Longaker MT. Concise review: Adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *Stem Cells* 2011;29(4):576–82.

11. Dismukes DI, Tomlinson JL, Fox DB, Cook JL, Song KJE. Radiographic Measurement of the Proximal and Distal Mechanical Joint Angles in the Canine Tibia. *Vet Surg* 2007;36(7):699–704.
12. Dismukes DI, Tomlinson JL, Fox DB, Cook JL, Witsberger TH. Radiographic measurement of canine tibial angles in the sagittal plane. *Vet Surg*. 2008;37(3):300–5.
13. Litrenta J, Tornetta P, Ricci W, Sanders RW, O'Toole R V., Nascone JW, et al. In Vivo Correlation of Radiographic Scoring (Radiographic Union Scale for Tibia Fractures) and Biomechanical Data in a Sheep Osteotomy Model: Can We Define Union Radiographically? *J Orthop Trauma* 2017;31(3):127–30.
14. Kooistra BW, Dijkman BG, Busse JW, Sprague S, Schemitsch EH, Bhandari M. The radiographic union scale in tibial fractures: Reliability and validity. *J Orthop Trauma*. 2010;24(SUPPL. 1).
15. Unger M, Montavon PM, Heim UFA. Classification of Fractures of Long Bones in the Dog and Cat: Introduction and Clinical Application. *Vet Comp Orthop Traumatol* 1990;3(2):41–50.
16. Perren SM. Biological internal fixation interface between biology and biomechanics. *Eur Cells Mater* 2003;5(SUPPL. 2):22–3.
17. Perren SM. Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84(8):1093–110.
18. Hudson CC, Pozzi A, Lewis DD. Minimally invasive plate osteosynthesis: applications and techniques in dogs and cats. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2009;22(3):175–82.

19. Peirone B, Rovesti GL, Baroncelli AB, Piras L. Minimally Invasive Plate Osteosynthesis Fracture Reduction Techniques in Small Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2012;42(5):873–95.
20. Boone EG, Johnson AL, Montavon P, Hohn RB. Fractures of the tibial diaphysis in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 1986;188(1):41–5.
21. Dudley M, Johnson AL, Olmstead M, Smith CW, Schaeffer DJ, Abbuehl U. Open reduction and bone plate stabilization, compared with closed reduction and external fixation, for treatment of comminuted tibial fractures: 47 cases (1980-1995) in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1997;211(8):1008–12.
22. Guiot LP, Déjardin LM. Prospective Evaluation of Minimally Invasive Plate Osteosynthesis in 36 Nonarticular Tibial Fractures in Dogs and Cats. *Vet Surg* 2011;40(2):171–82.
23. Whelan DB, Bhandari M, Stephen D, Kreder H, Mckee MD, Zdero R, et al. Development of the radiographic union score for tibial fractures for the assessment of tibial fracture healing after intramedullary fixation. *J Trauma - Inj Infect Crit Care*. 2010;68(3):629–32.
24. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011;42(6):551–5.
25. Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Matsubara T, Hirohata K. The osteogenetic potential of fracture haematoma. *J Bone Jt Surg* 1990;72(5):822–9.
26. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis P V. Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008;39(SUPPL.2).

27. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PLoS One* 2008;3(4):e1886.
28. Hendrich C, Franz E, Waertel G, Krebs R, Jäger M. Safety of autologous bone marrow aspiration concentrate transplantation: initial experiences in 101 patients. *Orthop Rev (Pavia)* 2009;1(2):e32.
29. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions: Surgical Technique. *JBJs Essent Surg Tech* 2006;os-88(1_suppl_2):322–7.
30. Gianakos A, Ni A, Zambrana L, Kennedy JG, Lane JM. Bone Marrow Aspirate Concentrate in Animal Long Bone Healing. *J Orthop Trauma* 2016;30(1):1–9.
31. Imam MA, Holton J, Ernstbrunner L, Pepke W, Grubhofer F, Narvani A, et al. A systematic review of the clinical applications and complications of bone marrow aspirate concentrate in management of bone defects and nonunions. *Int Orthop* 2017;41(11):2213–20.
32. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 2005 1;87(7):1430–7.
33. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211–28.
34. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *Stem Cells* 2012;30(5):804–10.

35. Tajima S, Tobita M, Orbay H, Hyakusoku H, Mizuno H. Direct and Indirect Effects of a Combination of Adipose-Derived Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Bone Regeneration. *Tissue Eng Part A* 2015;21(5–6):895–905.
36. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 2009;76(2):56–66.
37. Salgado AJBOG, Reis RLG, Sousa NJC, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010;5(2):103–10.